

Université de Montréal

**L'implication des répresseurs traductionnels 4E-BP1 et 4E-BP2 dans la régulation du sommeil**

par Cassandra Charbonneau-Areal

Département de Neurosciences  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Neurosciences

Août, 2019

© Cassandra C. Areal, 2019

*Ce mémoire intitulé*

**L'implication des répresseurs traductionnels 4E-BP1 et 4E-BP2 dans la régulation du sommeil**

*Présenté par*

Cassandra Charbonneau-Areal

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Jean-Claude Lacaille**

Président-rapporteur

**Valérie Mongrain**

Directrice de recherche

**Nahum Sonenberg**

Codirecteur

**Graziella Di Cristo**

Membre du jury

## Résumé

À la fois le sommeil et la privation de sommeil ont un impact sur la synthèse protéique au niveau du cerveau, mais la contribution des mécanismes traductionnels à la régulation de l'éveil et du sommeil n'a été que peu étudiée. Dans ce mémoire de maîtrise, nous étudions le rôle de deux répresseurs de la traduction protéique, les protéines de liaison du facteur 4E d'initiation eucaryote 1 et 2, 4E-BP1 et 4E-BP2 dans l'architecture du sommeil et l'activité électroencéphalographique (EEG), ainsi que dans la réponse EEG et moléculaire à la privation de sommeil. Ces deux protéines inhibent la synthèse protéique en séquestrant une protéine nécessaire à l'initiation de la traduction, eIF4E. Activé par différentes voies de signalisation intra- et extracellulaires, mTORC1 phosphoryle les 4E-BP, ce qui relâche l'inhibition et permet l'initiation de la synthèse protéique. 4E-BP1 est très exprimé au niveau des noyaux suprachiasmatiques et est impliqué dans les rythmes circadiens. 4E-BP2, très exprimé au niveau du cerveau, est nécessaire pour la mémoire et la plasticité synaptique. Des électrodes EEG et électromyographiques (EMG) ont été implantées chez des souris mutantes pour les gènes encodant 4E-BP1 ou 4E-BP2 (*Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> et *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup>). Les souris ont été enregistrées pendant 48h et soumises à une privation de sommeil de 6h au début de la seconde journée d'enregistrement. L'effet de la privation sur l'expression de certains gènes a également été mesuré dans le cortex préfrontal des souris. Les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> diffèrent des souris sauvages dans la quantité et la qualité du sommeil et de l'éveil. De légères différences au niveau de l'expression génique après privation ont également été trouvées. Les souris *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> présentaient, quant à elles, seulement des changements dans la qualité de l'activité EEG en éveil, révélé suite à la privation de sommeil. Les résultats de mon projet de maîtrise suggèrent une implication de la machinerie de traduction protéique dans la régulation du sommeil et de l'éveil, et pointent vers des rôles différents des deux répresseurs de la traduction.

**Mots-clés :** synthèse protéique, électroencéphalographie, analyse spectrale, privation de sommeil, expression génique

## Abstract

Albeit it is known that sleep and sleep loss are impacting protein synthesis in the brain, several unknowns persist about the contribution of the mechanisms of translational control to wakefulness and sleep regulation. In this master project, we studied the role of two suppressors of protein synthesis, the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and 2 (4E-BP1 and 4E-BP2) in sleep architecture and electroencephalographic (EEG) activity as well as in the EEG and molecular responses to acute sleep loss. These two proteins normally repress cap-dependent translation initiation by binding eIF4E. When activated by extracellular and intracellular signaling, mTORC1 phosphorylates 4E-BPs leading to their dissociation from eIF4E, thus allowing the translation initiation. 4E-BP1 is highly expressed in the suprachiasmatic nucleus and implicated in circadian rhythms. 4E-BP2, widely expressed in the brain, is critical for memory and plasticity. Yet, there is no data on their implication in sleep regulation. Mutant mice for the genes encoding 4E-BP1 or 4E-BP2 (*Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice) were implanted with EEG and electromyographic (EMG) electrodes and recorded under undisturbed conditions and following a 6-h sleep deprivation (SD). The effect of SD on the expression of genes known to respond to SD was also assessed in the prefrontal cortex of *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice. Mice lacking *Eif4ebp1* differed from wild-type mice regarding the quantity and quality of their sleep and wakefulness, and more subtly in the gene expression response to SD. Moreover, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice differed from wild-type mice only for wakefulness and sleep quality, changes in EEG spectral activity generally revealed during and after SD. The results of my master project point towards an implication of the translation machinery in the regulation of wakefulness and sleep and of synchronized cortical activity and suggest different roles of effectors of translational control

**Keywords :** protein synthesis, electroencephalography, spectral analysis, sleep deprivation, gene expression

# Table des matières

RÉSUMÉ .....	I
ABSTRACT .....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
REMERCIEMENTS .....	IX
<b>CHAPITRE 1 - INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 LE SOMMEIL .....	1
1.1.1 Les stades de sommeil et leur activité cérébrale .....	1
1.1.2 La régulation du sommeil .....	3
1.1.2.1 Processus S.....	4
1.1.2.2 Processus C.....	6
1.1.2.3 Interdépendance entre les processus S et C.....	7
1.1.3 La neurocircuiterie de l'éveil et du sommeil .....	8
1.1.3.1 Structures neuronales de l'éveil.....	8
1.1.3.2 Structures neuronales du sommeil .....	10
1.1.3.3 Influence des NSC sur le cycle éveil-sommeil .....	11
1.1.4 Pourquoi dormons-nous? L'importance du sommeil.....	12
1.1.5 Les conséquences d'une privation de sommeil .....	12
1.1.6 Article de revue de littérature .....	14
1.1.6.1 Contribution des co-auteurs.....	14
1.2 LA TRADUCTION .....	29
1.2.1 Les étapes de la traduction.....	29
1.2.2 eIF4E : facteur limitant de la traduction .....	30
1.2.3 Répresseurs de la traduction 4E-BP1 et 4E-BP2 .....	32
1.2.3.1 Régulation par la phosphorylation .....	33
1.2.3.2 Rôles des répresseurs de la traduction .....	35
1.2.4 mTOR.....	36
1.2.5 Voies activatrices/inhibitrices de mTORC1.....	38
1.2.6 Voies de signalisation .....	39
1.2.7 Rôles cellulaires.....	39
1.2.7.1 Horloge circadienne .....	40
1.2.7.2 mTOR-opathies.....	40
1.2.7.3 Plasticité synaptique .....	41
1.3 LIEN ENTRE LE SOMMEIL ET LA TRADUCTION .....	41
<b>CHAPITRE 2 – OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES .....</b>	<b>44</b>
2.1 OBJECTIFS .....	44
2.2 HYPOTHÈSES .....	44

<b>CHAPITRE 3 – MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS : ARTICLE DE RECHERCHE .....</b>	<b>45</b>
3.1    CONTRIBUTION DES CO-AUTEURS À L'ARTICLE .....	45
3.2    ARTICLE .....	46
<b>CHAPITRE 4 - DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>
4.1    RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DE RECHERCHE .....	75
4.2    RÔLE DES RÉPRESSEURS TRADUCTIONNELS 4E-BP1 ET 4E-BP2, ET DE LA KINASE MTOR DANS LA RÉGULATION DU SOMMEIL.....	76
4.2.1 <i>Implication de Eif4ebp1 dans l'architecture du sommeil .....</i>	<i>76</i>
4.2.2 <i>Effet de l'absence de Eif4ebp2 sur l'architecture du sommeil .....</i>	<i>77</i>
4.2.3 <i>Impact de l'absence de mtor sur l'architecture du sommeil .....</i>	<i>78</i>
4.3    MODIFICATIONS DE L'ACTIVITÉ EEG EN CONDITION CONTRÔLE ET SUIVANT LA PRIVATION DE SOMMEIL .....	79
4.3.1 <i>Chez les souris mutantes pour les répresseurs de la traduction 4E-BP1 ou 4E-BP2 .....</i>	<i>79</i>
4.3.2 <i>Chez les souris mutantes pour la kinase mTOR.....</i>	<i>81</i>
4.3    DISTRIBUTION DE L'ACTIVITÉ SPECTRALE SUR 24H .....	83
4.4    RÉPONSE MOLÉCULAIRE À LA PRIVATION DE SOMMEIL .....	85
4.5    EFFETS DIFFÉRENTIELS DES RÉPRESSEURS TRADUCTIONNELS 4E-BP1 ET 4E-BP2 DANS LA RÉGULATION DU SOMMEIL ET DE L'ÉVEIL .....	85
4.6    LIMITES DE L'ÉTUDE .....	87
4.6.1 <i>Utilisation de souris ne provenant pas de la même portée .....</i>	<i>87</i>
4.6.2 <i>Mutation touchant tout le corps.....</i>	<i>87</i>
4.7    CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	88
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>89</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES : SOURIS MTOR.....</b>	<b>I</b>

## Liste des tableaux

**Table 1.** Sequence of primers and probes, and reference number of probe sets used for qPCR. .... 69

# Liste des figures

## Chapitre 1 - Introduction

<b>Figure 1.1.</b> Activité électroencéphalographique (EEG; en noir) et électromyographique (EMG; en bleu) en éveil, en sommeil lent profond (SLP) et en sommeil paradoxal (SP) .....	3
<b>Figure 1.2.</b> Représentation schématique des trois processus qui sous-tendent le sommeil .....	4
<b>Figure 1.3.</b> Réseaux neuronaux responsables de l'éveil et du sommeil.....	10
<b>Figure 1.4.</b> Schematic view of the impact of sleep and sleep deprivation on spine formation and density .....	27
<b>Figure 1.5.</b> Schematic view of effects of acute sleep loss on synaptic features that can mediate structural reorganization .....	28
<b>Figure 1.6.</b> Représentation simplifiée du complexe d'initiation de la traduction et des protéines activatrices/inhibitrices associées.....	30
<b>Figure 1.7.</b> Alignement des séquences protéiques des trois 4E-BP chez la souris: 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 .....	33
<b>Figure 1.8.</b> Voies neuronales menant à l'activation de <i>mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1)</i> et mTORC2 ainsi que leurs effecteurs .....	37

## Chapitre 3 - Méthodologie et résultats : article de recherche

<b>Figure 3.1.</b> Baseline sleep architecture in <i>Eif4ebp1</i> <sup>-/-</sup> (BP1 <sup>-/-</sup> ) and <i>Eif4ebp2</i> <sup>-/-</sup> (BP2 <sup>-/-</sup> ) mice .....	66
<b>Figure 3.2.</b> Baseline EEG activity in <i>Eif4ebp1</i> <sup>-/-</sup> (BP1 <sup>-/-</sup> ) and <i>Eif4ebp2</i> <sup>-/-</sup> (BP2 <sup>-/-</sup> ) mice .....	66
<b>Figure 3.3.</b> Sleep architecture parameters during and after SD in <i>Eif4ebp1</i> <sup>-/-</sup> (BP1 <sup>-/-</sup> ) and <i>Eif4ebp2</i> <sup>-/-</sup> (BP2 <sup>-/-</sup> ) mice.....	67
<b>Figure 3.4.</b> EEG activity during and after SD in <i>Eif4ebp1</i> <sup>-/-</sup> (BP1 <sup>-/-</sup> ) and <i>Eif4ebp2</i> <sup>-/-</sup> (BP2 <sup>-/-</sup> ) mice .....	67
<b>Figure 3.5.</b> Expression of target genes after SD in the prefrontal cortex of <i>Eif4ebp1</i> <sup>-/-</sup> (BP1 <sup>-/-</sup> ) and <i>Eif4ebp2</i> <sup>-/-</sup> (BP2 <sup>-/-</sup> ) mice .....	68

## Chapitre 4 - Discussion

<b>Figure 4.1.</b> Architecture du sommeil chez les souris mTOR <sup>flx/flx</sup> (n=9) et mTOR <sup>flx/-</sup> (n=9) .....	78
<b>Figure 4.2.</b> Activité spectrale EEG en conditions de base, pendant et après privation de sommeil chez les souris mTOR <sup>flx/flx</sup> et mTOR <sup>flx/-</sup> .....	82
<b>Figure 4.3.</b> Distribution sur 48h de l'activité thêta (6-9Hz) en éveil, de l'activité delta (1-4 Hz) et sigma (10-13 Hz) en SLP chez les souris mTOR <sup>flx/flx</sup> et mTOR <sup>flx/-</sup> .....	84



## Liste des abréviations

4E-BP, *Eif4ebp* : *eIF4E-binding protein*  
5'UTR : *5' untranslated region*  
AKT : protéine kinase B  
AMP : adénosine monophosphate  
AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  
AMPK : AMP kinase  
AOL : activité à ondes lentes  
ARNm : ARN messenger  
ARNt : ARN de transfert  
BDNF : *brain derived neurotrophic factor*  
BF : prosencéphale basal (*basal forebrain*)  
BMAL1 : *Brain and muscle ARNT-like 1*  
CDK4 : *cyclin-dependent kinase 4*  
CLOCK : *Circadian locomotor output cycles kaput*  
Cry : *Cryptochrome*  
DEPTOR : *DEP domain containing mTOR interactin protein*  
DKO : double mutation (*double knock-out*)  
DMH : noyau dorsomédial de l'hypothalamus  
E-LTP : LTP de courte durée (*early LTP*)  
E/I : excitation/inhibition  
EEG : électroencéphalogramme  
eIF3 : *eukaryotic initiation factor 3*  
eIF4A : *eukaryotic initiation factor 4A*  
eIF4E : *eukaryotic initiation factor 4E*  
eIF4F : *eukaryotic initiation factor 4F*  
eIF4G : *eukaryotic initiation factor 4G*  
EMG : électromyogramme  
EOG : électro-oculogramme  
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GSK3 $\beta$  : *glycogen synthase kinase 3 beta*  
IGF-1 : *insulin-like growth factor*  
L-LTP : LTP à long terme (*late LTP*)  
LH : hypothalamus latéral (*lateral hypothalamus*)  
LTP : dépression à long terme (*long-term depression*)  
LTP : potentialisation à long terme (*long term potentiation*)  
m<sup>7</sup>GpppX : coiffe 5'  
MCH : *melanin-concentrating hormone*  
mEPSC : courant post-synaptique exciteur miniature (*miniature excitatory postsynaptic current*)  
mGluR : récepteur métabotrope glutamatergique  
mLST8 : *mammalian Lethal with Sec13 protein 8*  
MNK1 : *MAPK activated protein kinase 1*  
MS : septum médial (*medial septum*)  
mSin1 : *mammalian Stress-activated Map kinase-interactin protein 1*  
mTOR : *mechanistic/mammalian target of rapamycin*

mTORC1/2 : *mTOR complex 1 et 2*  
 NLGN : Neuroligin  
 NMDA : N-methyl-D-aspartate  
 NPAS2 : *Neuronal PAS domain protein 2*  
 NREM : *non rapid-eye movement*  
 NSC : noyaux suprachiasmatiques  
 ODP : *ocular dominance plasticity*  
 ORX : orexine  
 PABP I : *poly-A binding protein I*  
 PB : noyau parabrachial (*parabrachial nucleus*)  
*Per* : *Period*  
 PHAS : *Phosphorylated heat and acid soluble stimulated by insulin*  
 PI3KK : phosphatidylinositol 3-kinase  
 PIB : produit intérieur brut  
 PKC : protéine kinase C  
 PPT : noyau pédonculopontin  
 Pras40 : *proline-rich Akt substrate of 40kDa*  
 Protor1/2 : *protein observed with Rictor 1 and 2*  
 PV : parvalbumine  
 PZ : zone parafaciale (*parafacial zone*)  
 Raptor : *regulatory protein associated with mTOR*  
 RCPG : récepteur couple aux protéines G  
 REM : *rapid-eye movement*  
 Rheb : Ras homolog enriched in brain  
 Rictor : *rapamycin insensitive companion of mTOR*  
 RTK : récepteur tyrosine kinase  
 S6K : *p70 ribosomal protein kinase*  
 SLP : sommeil lent profond  
 SOM : somatostatine  
 SP : sommeil paradoxal  
 SPZ : zone sous-paraventriculaire (*subparaventricular zone*)  
 SRAA : système réticulaire activateur ascendant  
 SUM : noyau supramammillaire  
 TKO : triple mutation (*triple knock-out*)  
 TOP : *5' terminal oligopyrimidine tract*  
 TOS : *mTOR signaling*  
 TSA : troubles du spectre de l'autisme  
 TSC : *Tuberous Sclerosis Complex*  
 TSC1/2 : *Tuberous sclerosis complex 1 et 2*  
 VEGF : *vascular endothelial growth factor*  
 VIP : *vasoactive intestinal polypeptide*  
 VLPO : noyau ventrolatéral préoptique (*ventrolateral preoptic nucleus*)  
 VTA : aire tegmentaire ventrale (*ventral tegmental area*)

## Remerciements

Les remerciements qui suivent ne sont pas en ordre de priorité; tout le monde a une place spéciale dans mon cœur (et mon cerveau). Ils sont brefs ici, mais je pourrai vous les bonifier en personne!

Merci Valérie. Tu as su mieux me vendre que je ne l'aurais fait moi-même. Merci pour les nombreuses opportunités que tu m'as offertes et pour ta confiance. Tu m'as enseigné comment faire de la recherche de qualité et je t'en suis reconnaissante.

Aux membres du labo, et labos voisins, passés et actuels, merci pour la compagnie, les fous rires et les discussions (au point tel où on n'a jamais l'air de travailler...!). Mélanie, Emma, Erika, Nicolas, Pierre-Gabriel, Morgane, Neus, Lydia, Julien, Bong Soo, Simon, Anatolie. Si j'en ai oublié, mettez ça sur la fatigue.

Merci à mes parents pour leurs encouragements et leur soutien au quotidien. J'aurai finalement suivi vos traces! Et maman, j'apprécie ta capacité de relativisation. Je cite : « ne stresse pas avec ton mémoire Cassandra. De toute façon, à part Valérie et tes membres du jury, plus personne ne va la lire après ça ».

Merci à mes ami(e)s pour votre tendresse, votre écoute et leurs précieux conseils. Votre support m'a été des plus précieux au cours de la dernière année.

Et une petite pensée pour ceux/celles qui m'ont quittés.

# Chapitre 1 - Introduction

## 1.1 Le sommeil

Le sommeil et les rêves fascinent depuis la nuit des temps. Déjà à l'époque des civilisations grecques et romaines, ils étaient personnifiés par des divinités, Hypnos et Somnus. On considérait le sommeil comme un état près de la mort, comme en témoigne la filiation entre les dieux du sommeil et les dieux de la mort. En 400 av. J.C., Hippocrate postule que le sommeil serait causé par un retrait du sang vers les régions internes du corps, expliquant la froideur du corps du dormeur au toucher. Il aura fallu attendre plusieurs siècles pour que cette idée soit rejetée. En 1916, le neurologue Constantin Von Economo, suivant des analyses de cerveaux de patients décédés d'encéphalite virale, identifie l'hypothalamus comme siège de l'éveil et du sommeil [1]. Puis, quelques années plus tard en 1929, l'invention de l'électroencéphalogramme (EEG) a permis l'essor du champ d'étude sur le sommeil.

L'explosion des connaissances sur le sommeil dans les dernières décennies a permis de mieux comprendre l'importance du sommeil dans les fonctions physiologiques. La conservation du sommeil dans le règne animal témoigne de sa nécessité. Le sommeil serait universel dans la phylogénie des espèces, et a notamment été caractérisé chez l'humain, le chat, le rongeur, la mouche à fruit, la coquerelle et le vers nématode [2].

Le sommeil se définit selon certaines caractéristiques physiologiques précises, qu'il est possible de mesurer en laboratoire. Chez l'humain, le sommeil est mesuré par la polysomnographie, qui consiste en l'enregistrement de l'activité électrique musculaire, oculaire et corticale avec l'aide de l'électromyogramme (EMG), l'électro-oculogramme (EOG) et l'EEG, respectivement. Chez les rongeurs, le sommeil est traditionnellement étudié avec l'EEG et l'EMG. Malgré la présence de mouvements oculaires [3], l'EOG n'est pas nécessaire pour identifier les états de vigilance.

### 1.1.1 Les stades de sommeil et leur activité cérébrale

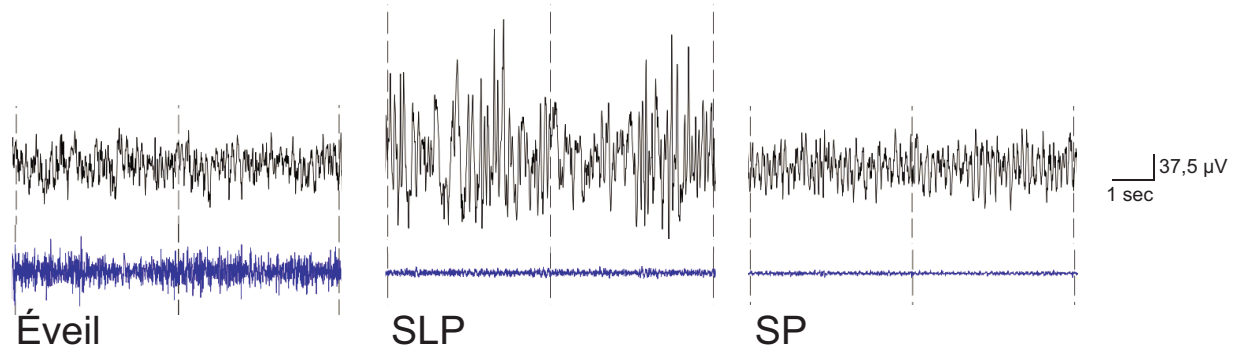
Le sommeil murin est composé de deux stades distincts, le sommeil lent profond (SLP) et le sommeil paradoxal (SP) (figure 1.1). La transition de l'éveil vers le SLP est associée un ralentissement de l'activité cérébrale, caractérisée par des ondes de plus basses fréquences et de haute amplitude. Les trois rythmes cardinaux observés en SLP sont les fuseaux de sommeil (7-14 Hz chez les chats, 12-15Hz chez les humains, 10-16 Hz chez les souris), les oscillations delta (1-4Hz) et les oscillations lentes (0,5-1 Hz), ayant des origines et des mécanismes cellulaires distincts

[4,5]. Les oscillations delta et lentes seront ensemble considérées dans le présent texte comme de l'activité à ondes lentes (AOL). Les fuseaux de sommeil et l'AOL se produisent de façon conjointe dès le début du sommeil [5]. Les fuseaux consistent en des potentiels de champ groupés en séquence, qui se reproduisent à chaque 3 à 10 secondes [4]. Ils résultent de l'activation rythmique (*spike-burst*) des neurones réticulaires thalamiques GABAergiques, qui promeut les décharges en bouffée des neurones thalamo-corticaux et des neurones corticaux pyramidaux [5]. Les oscillations delta en SLP sont générées par le réseau thalamo-cortical. Cette activité synchronisée est initiée par une diminution des afférences excitatrices en provenance du tronc cérébral [6], induisant une hyperpolarisation des neurones thalamo-corticaux [7]. Il en découle l'activation d'un courant entrant (courant H) qui finit par dépolariser le neurone thalamo-cortical [8], résultant en une activité en bouffée (*burst*) à une fréquence delta qui active les neurones pyramidaux du cortex [6,9]. Des projections cortico-thalamiques ferment la boucle, contribuant à la synchronicité du réseau. Plus la membrane est hyperpolarisée, plus les oscillations sont ralenties et le sommeil profond [4]. Durant l'éveil et le SP, cette activité en bouffée est inhibée par les afférences excitatrices du tronc, induisant plutôt une décharge tonique des neurones thalamocorticaux [10]. Les oscillations lentes, quant à elles, sont générées dans le cortex [11], et elles sont associées à de longues périodes de dépolarisation (*UP state*) intercalées avec des périodes soutenues d'hyperpolarisation (*DOWN state*) [12]. Ces événements oscillatoires lents, qui possèdent une cohérence spatio-temporelle, influencent directement d'autres patterns d'activation neuronale, comme les oscillations delta et les fuseaux de sommeil [5,10,13].

Après une période de SLP d'environ 10 minutes, la souris passe ensuite en SP. Appelé « *rapid-eye movement (REM)* » chez l'humain, car on y retrouve des mouvements rapides et synchronisés des yeux [14], il se caractérise par une atonie musculaire complète due à l'action hyperpolarisante de neurones à acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) et glycinergiques du bulbe ventromédial sur les motoneurones [15,16], ainsi que par une activité corticale rapide avec prépondérance d'ondes thêta, soit entre 6-9 Hz (Figure 1.1). Les oscillations thêta peuvent également être enregistrées en éveil actif, lorsque la souris adopte un comportement exploratoire [17,18]. Elles sont générées par les neurones GABAergiques du septum médial (MS; *medial septum*) qui projettent vers l'hippocampe [19,20].

L'animal pourra par la suite retomber en SLP ou s'éveiller. L'éveil est caractérisé par une activité EEG plus rapide, variable selon si c'est un éveil actif (autour de 9 Hz) ou calme et d'amplitude plus faible [17]. L'EMG variera lui aussi selon le type d'éveil (Figure 1.1). Les stades alternent d'une façon cyclique propre à chaque espèce. Les rongeurs présentent un sommeil fragmenté, organisé en cycle de 10 à 15 minutes [21], surtout concentré durant la photopériode en

captivité. L'humain passe par 4 ou 5 cycles par nuit, de 90 minutes chaque, composés de sommeil NREM (*non rapid-eye movement*) et de REM. Généralement, le sommeil est plus profond en début de nuit (i.e. composé de plus d'AOL) et la proportion de sommeil REM progresse au fur et à mesure que la nuit avance.



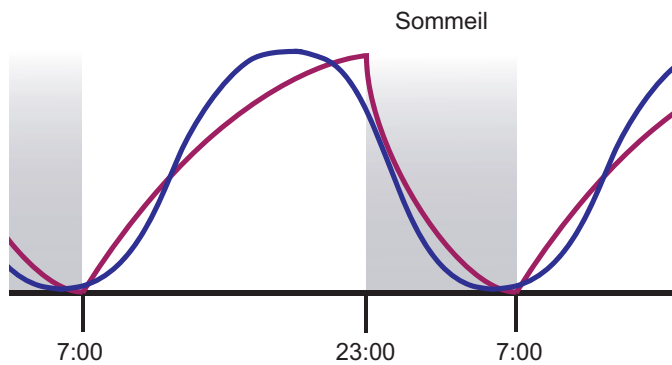
**Figure 1.1. Activité électroencéphalographique (EEG; en noir) et électromyographique (EMG; en bleu) en éveil, en sommeil lent profond (SLP) et en sommeil paradoxal (SP).** Les tracés sont d'une durée de 8 secondes. En éveil, il y a présence d'activité corticale rapide et de tonus musculaire. En SLP, on observe les ondes de haute amplitude et de basse fréquence, avec un faible tonus musculaire. En SP, l'EEG est caractérisé par une activité à prédominance thêta (6-9 Hz), et l'atonie musculaire est visible à l'EMG. *Figure créée par CCA.*

### 1.1.2 La régulation du sommeil

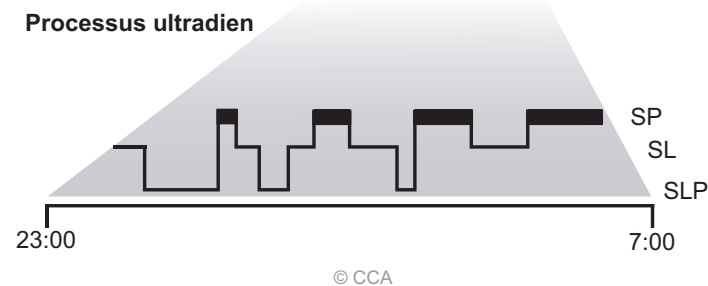
La quantité, la qualité et la structure du sommeil sont régulées par des processus ultradien, circadien et homéostatiques qui interagissent entre eux (Figure 1.2) [22]. Le processus homéostatique (processus S ou H), dont l'AOL (0,5-4Hz) en est le reflet, augmente en fonction de la quantité d'éveil et se dissipe durant le sommeil. Le processus circadien (processus C) se définit par l'alternance de périodes de faible propension au sommeil avec des périodes de forte propension, généralement indépendantes de l'historique d'éveil et sommeil [22]. Le processus ultradien, qui se caractérise par une période de moins de 24h, se produit durant le sommeil et représente l'alternance entre les états de sommeil, soit le SLP et le SP [22].

Les processus S et C sont indépendants selon le modèle proposé originellement par Borbély [22]. Effectivement, malgré l'abolition des rythmes circadiens par l'ablation des noyaux suprachiasmatiques (NSC), la réponse homéostatique à une privation de sommeil persiste [23]. Les processus S et C doivent cependant être synchronisés pour maximiser la qualité du sommeil et de l'éveil. En effet, la qualité du sommeil sera meilleure lorsque celui-ci est situé dans une phase circadienne ayant une faible propension à l'éveil. Chez l'humain, l'interaction de ces deux processus permet de maintenir un éveil soutenu pendant 16h, et en contrepartie de dormir de façon continue pendant les 8h suivantes.

**Processus homéostatique : pression au sommeil**  
**Processus circadien : propension circadienne à l'éveil**



**Figure 1.2. Représentation schématique des trois processus qui sous-tendent le sommeil.** SP : sommeil paradoxal; SL : sommeil lent; SLP : sommeil lent profond.  
*Figure créée par CCA.*



### 1.1.2.1 Processus S

Le terme « homéostasie du sommeil » a été proposé par Borbely en 1982 pour caractériser l'aspect de la régulation du sommeil dépendant de l'éveil et du sommeil [24]. Le processus S, qui représente la dette de sommeil, augmente durant l'éveil et se dissipe au fur et à mesure que le sommeil progresse. Cet aspect homéostatique du sommeil serait universel chez les mammifères et les oiseaux [2].

#### Marqueurs EEG du processus S

L'AOL, soit les oscillations delta (1-4 Hz) et les oscillations lentes (< 1Hz), en SLP sont généralement acceptées comme étant un corrélat électrophysiologique du processus S. Selon quelques études, il semblerait que l'AOL de basse fréquence (< 2 Hz) soit un indicateur plus sensible de l'homéostasie du sommeil [25-27]. Chez tous les mammifères, le sommeil riche en ondes lentes prédomine en début de nuit, reflétant la haute pression homéostatique qui s'est accumulé durant l'éveil précédent. L'intensité des oscillations est maximale et globale au début de la période de sommeil, et diminue progressivement au courant de la période de sommeil [28]. Il semble que plus cette pression au sommeil est élevée, plus les neurones demeurent longtemps en phase d'hyperpolarisation (*DOWN state*) et plus ils sont synchrones [29]. Au fur et à mesure que le sommeil avance, les phases de dépolarisation (*UP state*) s'allongent et sont plus désynchronisées

[30]. L'homéostasie du sommeil ne serait pas seulement un phénomène global, mais montre une régionalisation. Alors qu'elles émanent de toute la surface corticale en début de nuit, les ondes lentes se produisent plus localement vers la fin du sommeil [31]. De plus, l'activation de régions spécifiques du cerveau en éveil est associée à une AOL majorée lors du sommeil subséquent dans ces mêmes régions [32,33]. Les propriétés des ondes lentes changent également d'une région du cerveau à l'autre [7].

L'augmentation de la propension au sommeil peut également se mesurer par une augmentation de l'activité thêta en éveil, à la fois chez l'humain et l'animal [34,35]. Les oscillations bêta (15-35 Hz) en éveil lent seraient aussi un marqueur du processus homéostatique [36].

Lorsque le sommeil est perdu (i.e. privation de sommeil), cette perte est compensée lors du sommeil subséquent, par une augmentation de l'intensité du sommeil, donc de l'AOL. Chez les mammifères, une relation dose-réponse entre la durée de l'éveil et l'AOL dans le SLP subséquent est observée [2]. La privation de sommeil est la façon d'étudier l'homéostasie du sommeil en laboratoire. L'amplitude et l'incidence de l'AOL sont modulées par plusieurs autres facteurs, incluant le développement du cerveau et le vieillissement [37-39], et les médicaments [40,41]. Également, la régulation de l'homéostasie du sommeil est sous important contrôle génétique [17,42,43].

### **Marqueurs moléculaires du processus S**

La régulation du processus S et les mécanismes cellulaires responsables sous-jacents sont très peu compris. Un gène a été identifié comme un marqueur moléculaire de l'homéostasie du sommeil, *Homer1a* [44]. En effet, l'augmentation de *Homer1a* ne dépend pas du temps circadien, mais plutôt de la pression au sommeil [45]. L'expression protéique et du transcrit est augmentée après une privation de sommeil dans le cortex cérébral [44]. *Homer1* est un gène complexe comportant trois variants d'épissage (1a, 1b et 1c), dont la protéine en est une d'échafaudage localisée aux densités post-synaptiques des synapses excitatrices. Elle permet d'ancrer les récepteurs métabotropiques glutamatergiques 1 et 5 (mGluR1/5) à leur partenaire de signalisation [46]. *Homer1a* est la forme courte de *Homer1* [47]. Il ne possède pas le domaine essentiel à la formation de complexes multimériques, antagonisant l'activité de la forme longue en entrant en compétition avec les mGluR1/5 [46]. *Homer1a* est un gène de réponse immédiate, rapidement activé par l'activité neuronale, l'apprentissage et suivant la potentialisation à long terme (LTP; *long-term potentiation*) [47]. Les niveaux de *Homer1a* peuvent être régulés par la transcription. Sa transcription est augmentée par BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) [48]. L'expression de BDNF est aussi augmentée dans le cortex après une période d'éveil, et corrèle avec l'AOL dans le sommeil subséquent [49].



mGluR5 pourrait également jouer un rôle dans la régulation homéostatique du sommeil, comme « senseur » du besoin de sommeil. L'AOL en sommeil, marqueur de l'homéostasie du sommeil, corrèle avec la disponibilité des mGluR5 à la surface cellulaire, indépendamment de l'expression d'ARNm et de protéines [50,51]. L'absence de mGluR5 chez la souris altère la réponse homéostatique, empêchant l'augmentation des ondes lentes pendant l'éveil [50].

L'AMP kinase (AMPK) contribuerait à la régulation homéostatique du sommeil. À la fois l'inhibition et l'activation d'AMPK dans le cerveau empêche le rebond d'ondes lentes suite à la privation de sommeil, sans modifier la quantité de sommeil [52]. Cette kinase fonctionne comme un senseur du statut métabolique de la cellule, elle est activée par un ratio AMP/ATP augmenté (voir section 1.2.4).

Les astrocytes seraient également importants pour la régulation du sommeil, de par leur position privilégiée leur permettant de sentir l'activité neuronale d'en moduler l'activité via la relâche d'ATP, de glutamate ou de D-sérine [53]. Les niveaux d'adénosine, issue de la dégradation de l'ATP, varie selon la propension au sommeil [54]. L'accumulation d'adénosine astrocytaire et son action sur les récepteurs A1, surtout au niveau du cortex et du prosencéphale basal (BF; *basal forebrain*), favorisent la génération des oscillations lentes et le contrôle de l'homéostasie du sommeil [27].

### **1.1.2.2 Processus C**

Chez les mammifères, l'horloge circadienne est située dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus, consistant en deux noyaux de 10 000 neurones chacun [55] siégeant au-dessus du chiasma optique, à la base du 3<sup>e</sup> ventricule. De nombreuses études ont démontré que l'activité oscillatoire sur 24h des NSC permet la synchronisation de la plupart des processus physiologiques endogènes et comportementaux avec le cycle lumière-obscurité [23,56-58]. La voie rétino-hypothalamique, naissant des axones des cellules ganglionnaires à mélanopsine situées dans la rétine, permet aux NSC de percevoir la lumière et ainsi être en phase avec le temps extérieur; en effet, les neurones des NSC sont hyperpolarisés durant leur nuit subjective, ce qui diminue leur fréquence de décharge [59]. La nuit subjective réfère à la portion du cycle circadien, en conditions constantes, qui correspond à la nuit dans un cycle lumière-obscurité.

#### **Marqueurs moléculaires du processus C**

Le rythme circadien au niveau cellulaire est auto-généré par une boucle de rétroaction transcriptionnelle-traductionnelle régulée par les gènes de l'horloge. Le cœur de cette boucle de rétroaction moléculaire est composé d'éléments positifs et négatifs [60]. Chez les mammifères, les éléments régulateurs positifs sont trois facteurs de transcription : CLOCK (*Circadian locomotor*

*output cycles kaput*), NPAS2 (*Neuronal PAS domain protein 2*) et BMAL1 (*Brain and muscle ARNT-like 1*). BMAL1 peut s'associer en hétérodimère avec CLOCK ou NPAS2, et activer la transcription des gènes *Period* (*Per*) et *Cryptochrome* (*Cry*) en se liant à des séquences consensus E-boxes. Une fois traduites, les protéines PER et CRY inhibent la transcription médiée par CLOCK:BMAL1 et NPAS2:BMAL1, formant ainsi les éléments négatifs de la boucle de rétroaction [61].

### **Marqueurs EEG du processus C**

En recherche humaine et animale, certains marqueurs physiologiques facilement mesurables peuvent nous donner une indication du rythme circadien endogène. La température corporelle, le cortisol et la mélatonine [62] oscillent sur 24h, mais sont en plus influencés par des facteurs exogènes, comme l'exercice, le stress et l'exposition à la lumière bleue, à moins que l'organisme soit maintenu en conditions constantes. L'EEG est également un outil de mesure non-invasif permettant de capter l'état de l'horloge centrale. La bande de fréquence sigma, qui comprend les fuseaux de sommeil, se trouve à être sous forte influence circadienne [63,64], entre 12,25-13 Hz et 14,25-15Hz chez l'humain [65]. De plus, l'activité thêta (6-9Hz dans notre article) en SP est très influencée par le processus C [66]. Les paramètres de latence à l'endormissement, de latence au SP et de consolidation du sommeil sont également régulés par le rythme circadien [67].

#### **1.1.2.3 Interdépendance entre les processus S et C**

L'indépendance des aspects circadien et homéostatique de la régulation du sommeil est centrale dans le modèle de la régulation du sommeil chez l'humain [22]. Dans le modèle classique à deux processus, le processus S n'influçait pas le fonctionnement de l'horloge circadienne, et inversement, le processus C ne changeait pas selon la phase circadienne. De plus en plus d'évidences suggèrent une influence mutuelle [60,68].

L'horloge circadienne semble influencer les mécanismes d'homéostasie du sommeil [68]. La quantité d'ondes lentes ne serait pas seulement fonction de l'éveil accumulée, mais dépendrait aussi du moment dans la journée où la privation de sommeil survient [45]. En effet, l'exactitude de la prédiction du processus S dépend du temps du jour [45,69,70]. Au niveau moléculaire, une délétion complète chez les animaux ou des polymorphismes chez les humains des gènes de l'horloge modifient les marqueurs du processus S [71-73]. Inversement, de nombreuses études ont montré que la pression au sommeil affecte le fonctionnement de l'horloge circadienne. L'expression des gènes de l'horloge *Per 1* et *Per2* dans différentes régions du cerveau est augmentée par une privation de sommeil chez les souris [73-75]. L'augmentation de la pression au sommeil (par privation de sommeil) diminue la sensibilité de l'horloge circadienne à la lumière [76,77]. Également,

l'amplitude circadienne de plusieurs fonctions physiologiques est modulée par la pression homéostatique au sommeil [28,64,78].

Pour conclure, l'horloge circadienne et les mécanismes de l'homéostasie du sommeil régulent ensemble l'occurrence de l'éveil et du sommeil, ainsi que leur qualité respective. Cette relation réciproque entre les deux processus semble bénéfique, puisqu'un rythme soutenu (i.e. de grande amplitude) aide le sommeil, et un sommeil de qualité renforce le fonctionnement de l'horloge. Cela suggère que les régulateurs transcriptionnels-traductionnels qui supportent le rythme circadien pourraient aussi réguler les oscillations de l'homéostat du sommeil.

### **1.1.3 La neurocircuiterie de l'éveil et du sommeil**

Depuis les années 1900, on parle d'un système ascendant de l'éveil, originaire du tronc cérébral, qui maintient le cortex éveillé. En 1949, Moruzzi et Magoun [79] identifient ce réseau comme le système réticulaire activateur ascendant (SRAA), qui comporte une voie dorsale et une voie ventrale. Classiquement, la voie dorsale comprend les neurones cholinergiques des noyaux pédonculopontin (PPT) et du tegmentum latérodorsal (LDT) ainsi que des neurones glutamatergiques de la formation réticulée bulbaire et pontine [80-82]. Les fibres ascendantes de la voie ventrale originent du locus coeruleus (LC; noradrénaline) [83], du noyau raphé dorsal (DR; sérotonine) [84], du noyau parabrachial (PB; *parabrachial nucleus*; glutamate) et projettent vers le noyau tubéromammillaire (TMN; histamine) et l'hypothalamus latéral (LH; *lateral hypothalamus*) [82,85]. Des évidences de la dernière décennie ont démontré que ce modèle était incomplet, la destruction de certains noyaux du SRAA n'avait que peu d'effet sur la quantité d'éveil et de sommeil chez les rongeurs [86-89]. Cela a mené à l'émergence d'un nouveau paradigme, qui postule que ce serait plutôt les neurotransmetteurs rapides (GABA et glutamate) qui seraient à la base du réseau d'éveil-sommeil [86,87]. Ces systèmes interagiraient avec les voies modulatrices du SRAA, qui ont été décrits dans les revues de littératures suivantes [90,91]. Les paragraphes qui suivent vont plutôt présenter l'implication des neurotransmetteurs rapides dans la régulation de l'éveil et du sommeil.

#### **1.1.3.1 Structures neuronales de l'éveil**

Le prosencéphale basal (BF; *basal forebrain*) contient trois populations neuronales distinctes : cholinergiques (promotion de l'éveil), glutamatergiques (promotion de l'éveil) et GABAergiques [92] (Figure 1.3). Les neurones GABAergiques du BF sont composés de deux sous-populations distinctes : parvalbumine (PV) et somatostatin (SOM). L'activation des cellules à PV augmente la fréquence de l'activité corticale et favorise l'éveil [93,94]. Les neurones à SOM ont

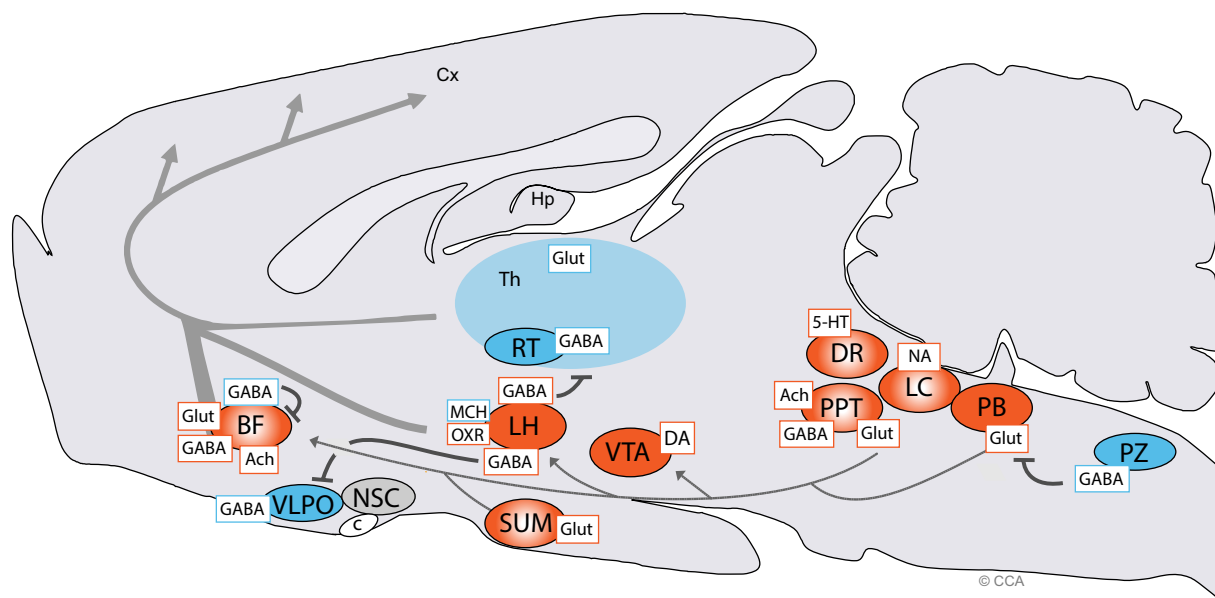
plutôt un effet antagoniste, leur activation favorise le SLP en inhibant les autres populations neuronales du BF [92].

Les neurones glutamatergiques des noyaux PB et PPT semblent très impliqués dans la genèse de l'éveil. Les neurones glutamatergiques du PB, via ses projections vers les structures de l'éveil du prosencéphale (thalamus, hypothalamus, BF, cortex), induisent l'éveil [95]. Le PPT, qui contient également des populations neuronales GABAergique et cholinergique entremêlées [96], envoie beaucoup de projections glutamatergiques vers le BF et le LH [97]. Kroeger et collègues [97] ont montré que la stimulation des neurones glutamatergiques de cette région induit un éveil prolongé et une activation corticale. Ces mêmes neurones innervent richement l'aire tegmentaire ventrale (VTA; *ventral tegmental area*), dont les neurones dopaminergiques sont nécessaires pour le maintien de l'éveil, surtout lors de la présence d'un stimulus motivant [98].

Les neurones supramammillaires (SUM; *supramammillary nucleus*) projettent massivement vers le BF [92], le cortex [99] et l'hippocampe [99,100]. En plus de participer à la genèse du rythme thêta hippocampique en SP [101], la relâche de glutamate des neurones SUM est nécessaire pour une quantité d'éveil normale et une activité thêta à l'EEG durant l'éveil [102].

Afin d'ajouter à la complexité du système de l'éveil, deux systèmes peptidergiques importants ont été décrits dans le LH : les neurones à orexine (ORX) et les neurones à MCH (*melanin-concentrating hormone*). Ces derniers seront décrits dans la section 1.1.3.2. Les neurones à ORX, qui donnent naissance à des projections diffuses vers le cortex et tous les autres neurones du SRAA [90], sont préférentiellement actifs durant l'éveil [103]. De plus, leur activation promeut l'éveil et semble particulièrement importante pour réguler les transitions vers l'éveil [104]. Ils reçoivent des projections de nombreuses régions du SRAA [90]. Ainsi, ces neurones apparaissent comme un intégrateur central de l'éveil. L'absence d'ORX impacte l'activité spectrale chez les souris, notamment en diminuant l'activité delta en SLP durant la nuit [18].

Finalement, deux études récentes ont démontré l'importance de populations GABAergiques dans la promotion de l'éveil (Figure 1.3). Ces deux populations sont situées dans l'hypothalamus latéral et ont des fonctions indépendantes [105]. Dans le LH ventral, un groupe de neurones, vraisemblablement par des projections inhibitrices au noyau ventrolatéral préoptique (VLPO; *ventrolateral preoptic nucleus*), promeut l'éveil [105]. Herrera et collègues [106] ont quant à eux montré que des neurones GABAergiques du LH déchargent, en éveil, vers les neurones thalamiques réticulaires GABAergiques, qui déchargent en bouffée en SLP [6].



**Figure 1.3. Réseaux neuronaux responsables de l'éveil et du sommeil.** Vue sagittale d'un cerveau de rongeur montrant les principaux noyaux impliqués dans la régulation de l'éveil et du sommeil ainsi que leurs neurotransmetteurs respectifs. Les neurones qui sont actifs en éveil, montrés en orange, envoient des projections ascendantes vers le cortex afin de promouvoir l'éveil. Des neurones à GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) inhibent deux populations actives en sommeil. Les projections des neurones actifs en sommeil, illustrés en bleu, ne sont pas dessinées. 5-HT : sérotonine; Ach : acétylcholine; BF : prosencéphale basal (basal forebrain); c : chiasma optique; Cx : cortex; DA : dopamine; Glut : glutamate; Hp : hippocampe; LC : locus coeruleus; LH : hypothalamus latéral (lateral hypothalamus); ORX : orexine; MCH : hormone concentratrice de mélanine (melanin-concentrating hormone); NA : noradrénaline; NSC : noyaux suprachiasmatiques; PB : noyau parabrachial; PPT : tegmentum pédonculopontin; PZ : noyau parafacial; RT : noyau réticulaire thalamique; SUM : noyau supramamillaire; Th : thalamus; VLPO : noyau ventrolatéral préoptique (ventrolateral preoptic nucleus); VTA : aire tegmentaire ventrale (ventral tegmental area). Figure créée par CCA, inspirée de Luppi et Fort [107].

### 1.1.3.2 Structures neuronales du sommeil

Les circuits neuronaux supportant l'émergence de l'éveil sont très diversifiés, alors que seulement quelques-uns ont été montrés comme favorisant le sommeil. L'aire préoptique de l'hypothalamus, plus précisément le VLPO et le noyau médian préoptique (MnPO; *median preoptic nucleus*) inhibent via le GABA et la galanine, de façon coordonnée et soutenue, le SRAA [108]. Leur fréquence de décharge est corrélée positivement à la durée et à la profondeur du sommeil [107]. Il semblerait que le VLPO favorise l'induction du sommeil alors que le MnPO régule l'homéostasie du sommeil [107]. Dans le LH, la distribution des neurones à MCH chevauche celle des neurones à ORX. Les neurones MCH projettent également vers le cortex, et sont actifs de façon réciproque aux neurones à ORX, en ne déchargeant qu'en sommeil, surtout en SP [109]. L'activité des neurones MCH favorise le sommeil [110].

Une autre population, plus récemment découverte et pouvant avoir une implication dans le sommeil sont les neurones GABAergiques de la zone parafaciale (PZ; parafacial zone) du tronc cérébral. Une ablation de ces neurones induit un éveil [111], alors que leur activation promeut le SLP [112]. Ces neurones inhibent les neurones glutamatergiques du PB [112].

### **1.1.3.3 Influence des NSC sur le cycle éveil-sommeil**

Des projections bidirectionnelles médient les interactions entre les NSC et la neurocircuiterie de l'éveil et du sommeil. Les NSC projettent de façon modeste vers le VLPO [113,114] et les neurones à ORX [115]. Leurs projections vers le réseau de l'éveil et du sommeil sont principalement indirectes, en faisant relai dans le noyau dorsomédial de l'hypothalamus (DMH), ainsi que dans la zone sous-paraventriculaire (SPZ; *subparaventricular zone*) [91,116], qui contient une portion ventrale (vSPZ), juste au-dessus des NSC et une portion dorsale (dSPZ), sous le noyau paraventriculaire [117]. Une cible majeure de la SPZ est le DMH [117]. Le DMH semble donc particulièrement important pour connecter les NSC au système de régulation du sommeil, puisqu'une lésion du DMH chez les rats abolit la rythmicité circadienne du cycle éveil-sommeil [118]. En effet, le DMH projette massivement vers le VLPO [114], le LC [116] et les neurones à ORX du LH [115,119]. Les projections du DMH vers le VLPO sont principalement GABAergiques, ce qui promeut l'éveil via l'inhibition des neurones à galanine du VLPO [114,118]. Les afférences arrivant au LH, en provenance du DMH, sont de nature glutamatergique, ce qui favorise l'éveil [118].

En contrepartie, les efférences des centres de l'éveil et du sommeil vers les NSC permettent aux états de vigilance de directement moduler l'activité des neurones des NSC. En plus d'une modulation du taux de décharge selon le temps endogène comme mentionné précédemment, les stades de sommeil influencent également l'activité neuronale des NSC. La fréquence de décharge est augmentée durant l'éveil et le SP comparativement au SLP [120], et ces changements sont surimposés à la modulation circadienne de l'activité des NSC. Ainsi, ces données confirment l'interdépendance entre le besoin de sommeil et la temporalité du sommeil.

### **1.1.4 Pourquoi dormons-nous? L'importance du sommeil**

Le sommeil a un rôle bénéfique indéniable sur notre santé physique et psychologique. Même avant la naissance, le sommeil est crucial pour le fœtus, le préparant à naître [121]. À l'autre spectre de la vie, un meilleur sommeil est prédicteur d'une meilleure santé physique et mentale [122]. Le sommeil favorise la consolidation de la mémoire déclarative, procédurale et émotionnelle, et notamment celle dépendante de l'hippocampe [123]. Le sommeil promeut la formation de synapses dépendantes de l'apprentissage, ce qui contribue au stockage mnésique [124]. En plus de la mémoire, le sommeil aurait une importante fonction restauratrice. Plusieurs gènes impliqués dans la régulation du métabolisme sont synthétisés en sommeil [125] et le sommeil serait nécessaire pour les processus anaboliques [126]. Une autre fonction proposée du sommeil serait d'effectuer la clairance des déchets métaboliques qui se sont accumulés durant l'éveil, via le système glymphatique [127].

### **1.1.5 Les conséquences d'une privation de sommeil**

Le manque de sommeil est connu comme étant un problème majeur de santé publique, ayant des conséquences économiques colossales; le coût annuel relié aux conséquences d'un mauvais sommeil et du manque de sommeil au Canada a été estimé à 21,4 milliards de dollars en 2017, soit 1,35% du produit intérieur brut (PIB) [128]. Son étiologie est multiple : habitudes de vie, facteurs socio-démographiques, conditions de travail, facteurs psychologiques, santé mentale, etc. Une dette de sommeil est associée à un risque augmenté de mortalité. Un individu dormant moins de 6h par nuit est 13% plus à risque de décéder qu'un adulte dormant le nombre d'heures recommandé (7h-9h) [128]. Le manque de sommeil touche aussi la santé individuelle, en diminuant l'immunité [129,130] et la réponse à la vaccination [131]. Un mauvais sommeil est délétère sur la santé cardiovasculaire, augmentant le risque de maladie coronarienne athérosclérosante [132] et d'hypertension [133-135]. Il est important de noter que des évidences épidémiologiques montrent que les longs dormeurs, défini généralement par plus de 9h de sommeil par nuit, sont également plus à risque de maladies et de décès comparativement à des dormeurs moyens [136,137].

Malgré la littérature croissante démontrant les bienfaits du sommeil, surtout chez les enfants et les adolescents, la population dort de moins en moins. Au Canada, seulement 69% des enfants/adolescents de 10 à 18 ans dorment le nombre d'heures recommandés (9-11h pour les 10 à 13 ans et 8 à 10h pour les 14-18 ans) [138]. Un manque de sommeil peut être détrimentaire pour les performances académiques, peut augmenter les abus de substances, les risques de dépression et les idées suicidaires [139]. Le risque relatif de dépression augmente de deux à quatre fois chez les patients souffrant d'insomnie, qui sont sujets à des privations de sommeil chroniques [140]. Un

manque de sommeil contribue également à la persistance de la dépression et diminue l'efficacité potentielle d'un traitement antidépresseur [140]. Au niveau cognitif, un éveil continu de 24h équivaut à un taux d'alcoolémie de 0,10% [141]. Les travailleurs de la santé, en particulier les médecins, subissent fréquemment des privations de sommeil de cette durée. Après une garde de nuit, qui équivaut à un éveil quasi continu de 24h, des études ont montré que les médecins avaient une capacité de prise de décision altérée : baisse de la mémoire de travail et du raisonnement perceptuel, diminution de la rapidité du traitement de l'information [142]. Ce manque de sommeil aigu s'ajoute bien souvent à un déficit chronique en sommeil, ce qui peut augmenter le risque d'erreurs médicales et d'accidents.

L'hippocampe serait particulièrement vulnérable aux conséquences du manque de sommeil [143]. Chez l'humain, une nuit de privation empêche l'encodage de nouvelles mémoires épisodiques [144], mémoire dépendante de l'hippocampe [145], tout en diminuant l'activation de l'hippocampe à l'IRM fonctionnel [144]. Les mêmes observations ont été faites chez les rongeurs, où une privation de sommeil de 5 ou 6h empêche la consolidation de mémoires relevant de l'hippocampe, sans affecter des types de mémoires indépendantes de l'hippocampe [123]. En plus d'avoir des conséquences au niveau comportemental, le manque de sommeil a des répercussions au niveau structurel selon de récentes recherches chez la souris. Une brève privation de sommeil de 6h diminue de façon extensive les épines dendritiques dans le gyrus denté [146] et la région CA1 de l'hippocampe [147].

Ces nombreuses évidences montrent qu'un manque de sommeil a des conséquences au niveau physiologique, moléculaire et structurel. L'article de revue suivant discutera de changements structurels liés au sommeil et à la privation de sommeil chez les vertébrés et les insectes, ainsi que leurs implications dans la régulation du sommeil et les fonctions du cerveau.



## 1.1.6 Article de revue de littérature

### 1.1.6.1 Contribution des co-auteurs

**Cassandra C Areal** a fait une revue de la littérature, a rédigé le manuscrit et a réalisé les figures. **Simon C Warby** a participé à la rédaction du manuscrit. **Valérie Mongrain** a rédigé le manuscrit. Les trois auteurs ont défini l'organisation des thèmes abordés.

## Sleep Loss and Structural Plasticity

Cassandra C. AREAL<sup>1,2</sup>, Simon C. WARBY<sup>1,3</sup>, Valérie MONGRAIN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Center and Center for Advanced Research in Sleep Medicine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, 5400 boulevard Gouin Ouest, QC, H4J 1C5, Canada; <sup>2</sup>Department of Neuroscience, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Qc, H3C 3J7, Canada; <sup>3</sup>Department of Psychiatry, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Qc, H3C 3J7, Canada

Running head: Sleep and synapse structure

Submitted for publication in: Current Opinion in Neurobiology

Content: 2803 words excluding references, 56 references, 2 figures

Acknowledgements: Authors are thankful to Paul Shaw and Robbert Havekes for discussions and comments on the manuscript.

Funding: This work was supported by fellowships from the Université de Montréal to CCA, by salary awards from the Fonds de recherche du Québec - Santé to SCW and VM, by a salary award from the Canadian Institutes of Health Research and a Canada Research Chair to VM. SCW is funded by CIHR and the Chair Pfizer, Bristol-Myers Squibb, SmithKline Beecham, Eli Lilly in psychopharmacology at the Université de Montréal.

Conflicts of interests: None of the authors have conflict of interest.

## **ABSTRACT**

Wakefulness and sleep are dynamic states during which brain functioning is modified and shaped. Sleep loss is detrimental to many brain functions and results in structural changes localized at synapses in the nervous system. In this review, we present and discuss some of the latest observations of structural changes following sleep loss in some vertebrates and insects. We also emphasize that these changes are region- and cell type-specific and that, most importantly, these structural modifications have functional roles in sleep regulation and brain functions. Selected mechanisms driving structural modifications occurring with sleep loss are also discussed. Overall, recent research highlights that extending wakefulness impacts synapse number and shape, which in turn regulate sleep need and sleep-dependent learning/memory.

## **HIGHLIGHTS**

- ▶ Acute sleep loss modifies synaptic structure in a region-dependent manner.
- ▶ Sleep loss mostly reduces dendritic spine number in the mammalian brain.
- ▶ Structural changes are mechanistically linked to sleep regulation and learning/memory.
- ▶ Diverse molecular mechanisms shape sleep-dependent structural changes.

## INTRODUCTION

Sleep is required for life in mammals as well as many non-mammalian species. Accordingly, sleep loss triggers numerous consequences for the nervous system and also importantly impacts other physiological functions [1]. In the nervous tissue specifically, current research supports that preventing sleep for only few hours can modify the structure of cellular compartments, especially for compartments serving neuronal communication such as dendritic spines [2•,3•]. Similar structural changes have also been reported to occur under normal/undisturbed alternations of wakefulness and sleep states. For instance, a higher number of synaptic puncta was observed in the day compared to the night in orexin neurons in zebrafish [4•], and higher synapse density was shown in the mouse cerebral cortex or hippocampus during the early night compared to early day [5,6]. However, these last observations may also be the results of simultaneous changes in internal circadian time [7], and we will thus here focus on research featuring sleep deprivation data. Importantly, the field has now entered an era that identifies the functional roles of sleep loss-driven structural changes in neuronal functions including in sleep regulation itself, which renders latest discoveries even more exciting in terms of their contribution to neuroscience.

We will first emphasize in this review some of the latest findings regarding the impact of sleep loss on the structure of specific components of the central nervous system, and then discuss their functional implications in sleep regulation and in sleep-dependent brain functions. Lastly, we will present some key mechanisms likely underlying these sleep loss-driven structural changes, and conclude with future steps to further understanding of origins and roles of structural changes occurring with sleep loss.

## PUNCTA, SPINES AND GLIA

The structural features that have received the most attention in sleep deprivation studies are the number of synaptic puncta or of dendritic spines [2•,3•,4•,8-11], which is generally considered an index of synapse number. Other structural aspects shown to be impacted by sleep loss concern the size of synaptic puncta [10•], the length of dendritic branches [2•,9], and the astrocytic coverage of (apposition to) synaptic contacts [12].

**Synaptic puncta.** Earlier findings have highlighted that sleep deprivation results in more synaptic puncta and spines in comparison to sleep in specific cell populations in zebrafish and *Drosophila* [4•,9]. These findings have recently been extended to a subset of neurons (R2 neurons) of the ellipsoid body (EB) of the fruit fly [10•]. The EB is part of the central complex of the fly head that comprises other sleep regulatory regions such as the dorsal fan-shaped body [13,14•]. In the study

of Liu and collaborators [10•], the presynaptic marker Bruchpilot (BRP) was used as an index of active zones. Sleep deprivation (12-h) increased both the number and size of BRP puncta, which was observed to be restored to baseline values 24-h after sleep deprivation. This observation was specific to R2 neurons as authors observed no increase in BRP staining in R3 cells, another neuronal subset of the EB, and in local neurons of antennal lobes. However, it remains to be determined if this observation is reflecting an increase in the number of synaptic contacts for a given neuronal branch size (i.e., density), or if sleep loss rather increases the length and arborisation of neurites, which results in increased puncta number but not necessarily density - two situations that can affect the magnitude of cell excitability differently. More spines after sleep deprivation have indeed been shown to be fully explained by increased dendrite length [9], and assessment of puncta density normalized per  $\mu\text{m}$  of neuronal branch would eventually clarify the scenario for R2 neurons. Importantly, for a given cell, structural changes following sleep deprivation seem to be synapse-specific. In fact, for orexin neurons of zebrafish larvae, the number of synaptic puncta of axons (i.e., presynaptic puncta) is increased by sleep deprivation [4•], but inhibitory synapses on dendrites of the same neurons are decreased [15]. The exact relationship between these changes remains to be identified, but decreased inhibition to these cells could induce a state of hyperexcitability.

**Dendritic spines.** In the cerebral cortex, two-photon sleep studies imaging the same neuronal branch of layer 5 pyramidal neurons across different sleep conditions indicated that spines are formed and eliminated during both wakefulness and sleep, and that sleep loss seems to reduce spine elimination compared to sleep in young mice [11,16] but not in adult mice [11]. Similarly, a more recent observation indicates that a 24-h sleep deprivation increases spine density of pyramidal neurons of the layer 3 of the prefrontal cortex in old rats only, and not in young adult animals [8]. This could suggest that the effect of sleep deprivation on spine number in the cerebral cortex of adult rodent are subtle, at least for the regions and cell types examined (e.g., pyramidal neurons of sensorimotor, barrel and prefrontal cortices). Alternatively, sleep loss-driven spine changes could depend on previous neuronal activity (e.g., learning task-dependent) or occur at only specific locations for a given cell. Indeed, a compelling study showed that sleep loss impairs the formation and survival of new spines on the apical tuft of layer V pyramidal neurons in the motor cortex after motor training [3•]. This observation was enabled by a detailed characterisation of different dendritic branches, and the resulting finding that motor training was driving spine formation preferably on specific branches [3•]. In this case, learning-associated spine formation was impaired by sleep deprivation on very specific neuronal branches of a precise cell type (Figure 1.4 (1)), which is reminiscent of the recent observations made in the hippocampus detailed below.

The hippocampus has repeatedly been shown to be impacted by sleep loss, which leads to impaired memory [Havekes and Abel, submitted to Curr Opin Neurobiol], and recent studies have also quantified structural changes in the hippocampus in response to sleep deprivation. A decrease in spine density was observed after 5h or 24h of sleep deprivation in the CA1 region [2•,8], but not in CA3 [2•]. In addition to a sleep loss-dependent reduction in spine density, Havekes and colleagues observed that sleep deprivation also reduced dendrite length and that both spine density and dendrite length were restored to non-sleep deprived values after recovery sleep [2•]. Again, this observation seems to apply to specific dendritic branches of pyramidal cells, because it was not the case for branches very close or far from the soma. In sum, pyramidal cells of both the cerebral cortex and the hippocampus respond to sleep deprivation by a decrease in spine number in comparison to a sleep condition (Figure 1.4 (1)). Although spines of pyramidal cells are defined postsynaptic structures allowing an easier quantification, future structural studies should also consider imaging the presynaptic compartment as well as synaptic contact in other cell types such as in cortical interneurons shown to respond to elevated sleep need [17•].

Thus, in general, sleep loss appears to increase synaptic puncta and spine number compared to sleep in neuronal populations of the fruit fly head, whereas in rodents, sleep loss leads to a lower spine density and shorter dendrite length. The reason for this difference is unclear but may reside in the fact that sleep-regulatory neurons have been studied in the fly, whereas neuronal populations regulating sleep-dependent functions but not tightly involved in sleep regulation were targeted in rodents. In addition, investigations of pre or postsynaptic structural markers are likely not directly comparable, and, for the dendritic tree only, structural changes should originate as a function of inputs received that will differ according to the location within the tree.

**Astrocytes.** Although the vast majority of structural changes characterized after sleep loss have been described for neurons, modifications are also to be expected for astrocytes in particular, given their required role in basal synaptic transmission and neuronal plasticity [18,19]. Astrocytes have a privileged access to synapses with their ‘morphologically active’ perisynaptic astrocytic processes (PAPs), whose motility is increased by synaptic activity [20]. PAPs were indeed shown to move closer to the synaptic cleft of larger spines after a 4-h sleep deprivation and after 4 days of sleep restriction in the mouse prefrontal cortex [12]. Recent observation of reversible changes in cellular localisation of glial glutamate transporter-1 as a function of sleep history in the mouse lateral hypothalamus also support structural changes in astrocytes associated with sleep loss in subcortical neuronal structures [Briggs et al., submitted]. Nevertheless, how acute sleep loss impacts the morphology of glial cells in different nervous tissues mostly remains to be established for both non-mammalian and mammalian species.

## FUNCTIONAL ROLES

Of great importance is the fact that structural changes observed in response to sleep loss have now been shown to have functional implications, and not solely a non-functional consequence of prolonged wake. This was to be expected as structural changes shape synaptic functioning. For instance, increased length of spine neck reduces synaptic strength as indexed by the amplitude of excitatory postsynaptic potential [21]. Two types of functional roles of sleep loss-dependent structural plasticity will be addressed in a nutshell below: their role in sleep regulation and in sleep-regulated functions.

**Regulation of sleep.** First, research in non-mammals supports that changes in synaptic puncta and spines are regulating sleep, because altering these structural features change sleep amount. For example, social enrichment in young flies, which was shown to increase synaptic puncta in ventral lateral neurons, results in increased sleep [22]. In older flies, social enrichment neither increase puncta number nor sleep, but increased sleep after social enrichment was restored by rescuing changes in synaptic puncta using different approaches [22]. In a zebrafish model of neurological disorder, decreased synapse density and number of dendritic branches associates with increased total sleep and sleep fragmentation [23]. Importantly, in the fly study mentioned above [10•], structural changes in the R2 neurons after sleep deprivation contributed to homeostatic sleep need as preventing sleep loss-driven changes in number and size of BRP puncta attenuated the sleep rebound. Therefore, structural synaptic changes appear causally linked to sleep regulation.

**Sleep-regulated functions.** Second, impairments in spine formation or density under sleep loss were directly shown to be detrimental to spatial memory and motor learning [2•,3•]. Specifically, in the article by Yang et al. [3•], sleep-dependent spine formation and survival in the motor cortex contributes to motor performance improvement in the rotarod task as quantified by increased average running speed, because sleep deprivation-induced attenuation of spine formation was detrimental to performance. Moreover, in the hippocampus, blocking structural changes occurring with sleep deprivation using two different genetic strategies prevented performance decrement in object recognition as well as the change of its electrophysiological correlate (i.e., long-term potentiation) [2•]. Recently, hippocampal sleep-dependent memory consolidation was shown to be regulated by rhythmic oscillations during sleep [24•]. Therefore, although sleep loss-driven structural changes in the hippocampus may be anticipated to mostly shape functions regulated by sleep and not necessarily sleep itself, the co-existing relationships between structural plasticity and memory and between memory and sleep oscillations may suggest a role for structural changes in sleep regulation more directly.

## UNDERLYING MECHANISMS

The identification of mechanisms underlying sleep loss-dependent structural plasticity will increase understanding of the roles of these changes in neuronal systems. Among the multiple molecular modifications that can impact neurons and glia morphology, we will briefly emphasize some of the most recent and relevant in the context of sleep deprivation.

**Neurotransmission and intracellular signaling.** One main pathway triggering structural changes with sleep loss applying to excitatory synapses concerns the cascade by which glutamate transmission changes calcium signaling (Figure 1.5 (2)). The modulation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors (NMDAR) activity is a well-documented way to modify the structure of dendritic spines [25], and sleep deprivation impacts NMDAR in different neuronal structures [10•,26,27]. As such, blocking NMDAR or intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  modifications prevent sleep deprivation-driven changes in the number and size of synaptic puncta [10•], while NMDAR inhibition attenuated sleep-dependent spine formation [3•]. In flies, sleep loss appears to increase NMDAR activity and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in specific circuits, which not only increases presynaptic puncta number and size, but could also explain increased neuronal excitability [10•,28]. In rodents, acute sleep loss changes NMDAR in a manner that decreases their  $\text{Ca}^{2+}$ -permeability (i.e., predominance of NR2A over NR2B) in both the hippocampus and cerebral cortex [26,27], which likely contributes to decreased phosphorylation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II (CamKII) [29] (Figure 1.5 (2)), a mechanism that can negatively regulate spine size [30]. In parallel, structural synaptic changes implicate signaling that impact the protein synthesis machinery [31], and sleep loss was shown to affect mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent protein synthesis [32,33], and to consequently impair sleep-regulated functions [34]. Sleep loss-dependent changes in the translation of structural components such as cytoskeleton and cell adhesion proteins are expected to underlie structural plasticity as discussed hereafter.

**Cytoskeleton and cell adhesion.** Presynaptic and postsynaptic structural changes need to involve modifications of the cytoskeleton. This has been elegantly shown by Havekes and coworkers [2•], who observed that decreased spine density and dendritic branch length after sleep deprivation in the hippocampus resulted in the activation, by de-phosphorylation, of the protein cofilin, which degrades actin filaments of the synapse (Figure 1.5 (2)). Interestingly, cofilin was shown to be regulated by the postsynaptic adhesion molecule Neuroligin-1 (NLGN1) [35], which itself regulates spine formation [36], and was observed to be decreased at the synapse by sleep deprivation in the mouse anterior forebrain [37]. The gene expression of Nlgn1 and other cell adhesion molecules as well as the protein level of cell adhesion elements was also shown to be modified by sleep deprivation in a brain area-dependent manner [37-41], providing a mechanism by which sleep loss

can modify synaptic structures. In addition, considerable support for a role of structural plasticity in sleep regulation comes from findings that sleep and neuronal activity during sleep are disrupted when proteins shaping the cytoskeleton and cell adhesion, such as Neurexin-1, Neuroligin-1, and the Ephrin receptor A4, are genetically modified [37-39,42-44].

**Glial functions.** As indicated above, astrocytes themselves are submitted to sleep loss-driven morphological changes, and a number of findings support a role for astrocytes in sleep regulation [45], notably involving intracellular  $[Ca^{2+}]$  increase and adenosine acting on neurons via A1 receptors [46-48]. Also, extracellular ion concentration has recently been shown to be causally linked to sleep-wake regulation [49], and astrocytes are predicted to be master regulators of extracellular ion concentration. These mechanisms are also potentially underlying a role for astrocytes in the regulation of neuronal morphology (Figure 1.5 (2)). In fact, astrocytes regulate synapse elimination during development likely via changes in intracellular  $[Ca^{2+}]$  and ATP release [50]. In both the hippocampus and somatosensory cortex, increased neuronal activity enhances the synaptic coverage by PAPs, through intracellular  $Ca^{2+}$  and metabotropic glutamate receptors (mGluR), which impacts spine stability [20]. Furthermore, besides astrocytes, changes in spine number with sleep deprivation could also be mediated by microglia, which have been shown to shape spine density [5]. Unfortunately, little is known about the role of non-astrocyte glia in sleep loss-induced structural neuronal changes.

## CONCLUSION

Overall, recent discoveries highlight that plastic structural changes occurring with sleep loss are various, depend on the structural element, and are functionally shaping neuronal networks and sleep. Structural plasticity is expected to contribute to stable cell-wide changes in neuronal activity, which takes place as a function of wakefulness [10•,51]. Of importance is the fact that acute sleep loss does not have a uniform impact on neuronal structures and systems. During prolonged wakefulness, sleep drive-related neuronal regions in *Drosophila* have the structure of their synaptic contacts enlarged [10•], whereas in mice, learning/memory-associated spine enhancement is reduced [2•,3•].

To further our understanding of sleep loss-induced structural plasticity, future research should: 1) simultaneously investigate pre and postsynaptic structures, as made possible by novel methodologies [52]; 2) examine intermediate states of dendritic spines, such as filopodia, which might correlate with changes in vigilance states [53]; 3) study changes in the length of spine neck that modifies excitatory postsynaptic potential [21]; and 4) consider interactions of cytoskeleton and



cell adhesion components. In mammals, specific roles of the different sleep states also need to be more systematically investigated to grasp the origin of structural modifications, because rapid eye movement (REM) and non-REM sleep were shown to be distinctly involved in different types of structural changes [3•,54]. Finally, an area that has received minor attention in the context of sleep loss in *Drosophila* and zebrafish is the role of the crosstalk between glia and neurons in shaping synaptic contact. Given the relative ease to image structural elements in these model organisms, such research will certainly help to expose the functions of glial cells in sleep regulation. A better understanding of the role of glial cells in sleep loss-driven structural neuronal changes will also clarify their roles in additional sleep-regulated functions like mood regulation [55,56].

## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Van Cauter E, Spiegel K, Tasali E, Leproult R: **Metabolic consequences of sleep and sleep loss.** *Sleep Med* 2008, **9 Suppl 1**:S23-28.
2. Havekes R, Park AJ, Tudor JC, Luczak VG, Hansen RT, Ferri SL, Bruinenberg VM, Poplawski SG, Day JP, Aton SJ, et al.: **Sleep deprivation causes memory deficits by negatively impacting neuronal connectivity in hippocampal area CA1.** *Elife* 2016, **5**.
  - This study showed that 5 hours of sleep deprivation decreases dendritic spine density selectively on specific dendritic branches of neurons of the hippocampal CA1 area. This change was reversible with sleep, associated with an increased activity of the filamentous actin severing protein cofilin, and was functionally linked to object recognition memory.
3. Yang G, Lai CS, Cichon J, Ma L, Li W, Gan WB: **Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning.** *Science* 2014, **344**:1173-1178.
  - This article used an innovative and robust approach and a simple and thorough protocol. It showed that sleep after motor learning promotes the formation and maintenance of postsynaptic dendritic spines on a subset of branches of layer V pyramidal neurons in the mouse motor cortex. Sleep deprivation, independent of corticosterone, importantly decreased spine formation following motor learning.
4. Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, Mourrain P, Mignot E: **Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons.** *Neuron* 2010, **68**:87-98.
  - The authors have shown, using a presynaptic marker, that synapse number in orexin/hypocretin neurons in zebrafish is modulated by the circadian clock and increased by sleep deprivation. They also reported that a protein implicated in glutamate receptor clustering, NPTX2, regulated circadian changes in synapse number.
5. Hayashi Y, Koyanagi S, Kusunose N, Okada R, Wu Z, Tozaki-Saitoh H, Ukai K, Kohsaka S, Inoue K, Ohdo S, et al.: **The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S.** *Sci Rep* 2013, **3**:2744.

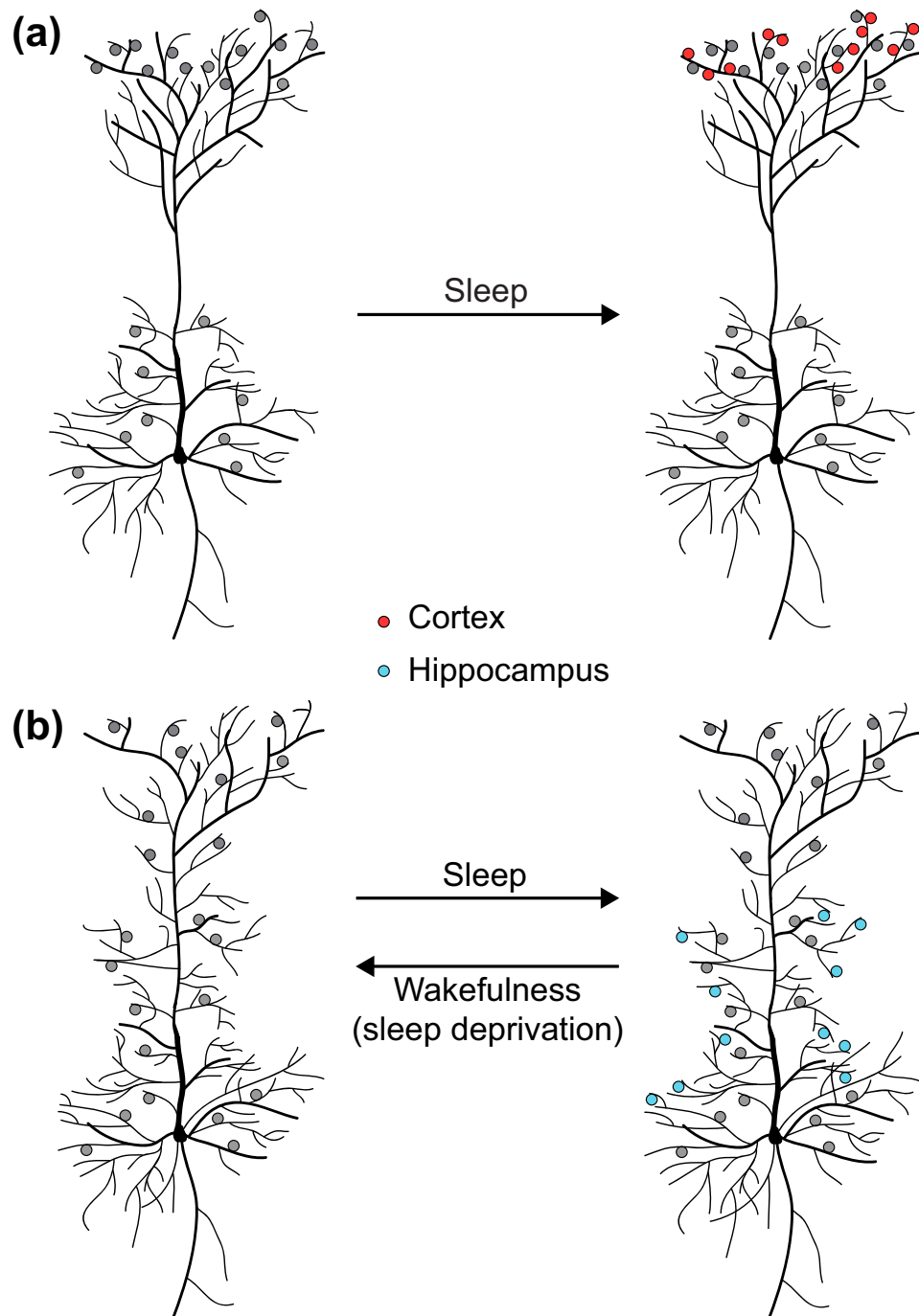
6. Ikeda M, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Okamoto M, Kato A, Takeda T, Kawato S: **Hippocampal spine changes across the sleep-wake cycle: corticosterone and kinases.** *J Endocrinol* 2015, **226**:M13-27.
7. Frank MG, Cantera R: **Sleep, clocks, and synaptic plasticity.** *Trends Neurosci* 2014, **37**:491-501.
8. Acosta-Pena E, Camacho-Abrego I, Melgarejo-Gutierrez M, Flores G, Drucker-Colin R, Garcia-Garcia F: **Sleep deprivation induces differential morphological changes in the hippocampus and prefrontal cortex in young and old rats.** *Synapse* 2015, **69**:15-25.
9. Bushey D, Tononi G, Cirelli C: **Sleep and synaptic homeostasis: structural evidence in *Drosophila*.** *Science* 2011, **332**:1576-1581.
10. Liu S, Liu Q, Tabuchi M, Wu MN: **Sleep drive is encoded by neural plastic changes in a dedicated circuit.** *Cell* 2016, **165**:1347-1360.  
 • This paper used sleep deprivation to increase sleep pressure combined with functional imaging and translational profiling. It showed that a subset of Ellipsoid body (EB) neurons of the fruit fly respond to sleep deprivation by increases in size of active zones indexed with bruchpilot puncta, in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels, in NMDA receptor expression, and in cell excitability. These changes were causally linked to sleep rebound after sleep deprivation.
11. Maret S, Faraguna U, Nelson AB, Cirelli C, Tononi G: **Sleep and waking modulate spine turnover in the adolescent mouse cortex.** *Nat Neurosci* 2011, **14**:1418-1420.
12. Bellesi M, de Vivo L, Tononi G, Cirelli C: **Effects of sleep and wake on astrocytes: clues from molecular and ultrastructural studies.** *BMC Biol* 2015, **13**:66.
13. Dissel S, Angadi V, Kirszenblat L, Suzuki Y, Donlea J, Klose M, Koch Z, English D, Winsky-Sommerer R, van Swinderen B, et al.: **Sleep restores behavioral plasticity to *Drosophila* mutants.** *Curr Biol* 2015, **25**:1270-1281.
14. Pimentel D, Donlea JM, Talbot CB, Song SM, Thurston AJ, Miesenböck G: **Operation of a homeostatic sleep switch.** *Nature* 2016, **536**:333-337.  
 • This article revealed that, in the fruit fly, dorsal fan-shaped body neurons change their activity pattern as a function of prolonged wakefulness and sleep, which depend on dopamine neurotransmission and potassium conductance. Importantly, these changes were linked to modifications in sleep drive.
15. Elbaz I, Zada D, Tovin A, Braun T, Lerer-Goldshtein T, Wang G, Mourrain P, Appelbaum L: **Sleep-dependent structural synaptic plasticity of inhibitory synapses in the dendrites of hypocretin/orexin neurons.** *Mol Neurobiol* 2016.
16. Yang G, Gan WB: **Sleep contributes to dendritic spine formation and elimination in the developing mouse somatosensory cortex.** *Dev Neurobiol* 2012, **72**:1391-1398.
17. Dittrich L, Morairty SR, Warrier DR, Kilduff TS: **Homeostatic sleep pressure is the primary factor for activation of cortical nNOS/NK1 neurons.** *Neuropsychopharmacology* 2015, **40**:632-639.  
 • This work defines the response of specific neurons, nNOS/NK1 neurons of the rat cerebral cortex, to sleep and sleep loss. Using sleep deprivation and pharmacological manipulation of non-REM sleep duration to dissociate sleep time from sleep need, it reports a lower proportion of activated nNOS/NK1 neurons (i.e., Fos+) when animals are under lower sleep need.
18. Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA: **Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes.** *Nature* 2010, **463**:232-236.

19. Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R: **Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses.** *Cell* 2011, **146**:785-798.
20. Bernardinelli Y, Randall J, Janett E, Nikonenko I, Konig S, Jones EV, Flores CE, Murai KK, Bochet CG, Holtmaat A, et al.: **Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability.** *Curr Biol* 2014, **24**:1679-1688.
21. Araya R, Vogels TP, Yuste R: **Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:E2895-2904.
22. Donlea JM, Ramanan N, Silverman N, Shaw PJ: **Genetic rescue of functional senescence in synaptic and behavioral plasticity.** *Sleep* 2014, **37**:1427-1437.
23. Zada D, Tovin A, Lerer-Goldshtein T, Vatine GD, Appelbaum L: **Altered behavioral performance and live imaging of circuit-specific neural deficiencies in a zebrafish model for psychomotor retardation.** *PLoS Genet* 2014, **10**:e1004615.
24. Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A: **Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation.** *Science* 2016, **352**:812-816.  
 • These convincing data showed that optogenetic silencing of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) neurons from the medial septum in mice, during REM sleep specifically, attenuates REM sleep theta activity without changing sleep duration. More importantly, this silencing drastically impaired both object recognition and contextual memory.
25. McKinney RA: **Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling.** *J Physiol* 2010, **588**:107-116.
26. Kopp C, Longordo F, Nicholson JR, Luthi A: **Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function.** *J Neurosci* 2006, **26**:12456-12465.
27. Xie M, Li C, He C, Yang L, Tan G, Yan J, Wang J, Hu Z: **Short-term sleep deprivation disrupts the molecular composition of ionotropic glutamate receptors in entorhinal cortex and impairs the rat spatial reference memory.** *Behav Brain Res* 2016, **300**:70-76.
28. Donlea JM, Pimentel D, Miesenbock G: **Neuronal machinery of sleep homeostasis in Drosophila.** *Neuron* 2014, **81**:860-872.
29. Cui SY, Li SJ, Cui XY, Zhang XQ, Yu B, Sheng ZF, Huang YL, Cao Q, Xu YP, Lin ZG, et al.: **Phosphorylation of CaMKII in the rat dorsal raphe nucleus plays an important role in sleep-wake regulation.** *J Neurochem* 2016, **136**:609-619.
30. Okamoto K, Narayanan R, Lee SH, Murata K, Hayashi Y: **The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:6418-6423.
31. Shih YT, Hsueh YP: **VCP and ATL1 regulate endoplasmic reticulum and protein synthesis for dendritic spine formation.** *Nat Commun* 2016, **7**:11020.
32. Seibt J, Dumoulin MC, Aton SJ, Coleman T, Watson A, Naidoo N, Frank MG: **Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo.** *Curr Biol* 2012, **22**:676-682.
33. Tudor JC, Davis EJ, Peixoto L, Wimmer ME, van Tilborg E, Park AJ, Poplawski SG, Chung CW, Havekes R, Huang J, et al.: **Sleep deprivation impairs memory by attenuating mTORC1-dependent protein synthesis.** *Sci Signal* 2016, **9**:ra41.

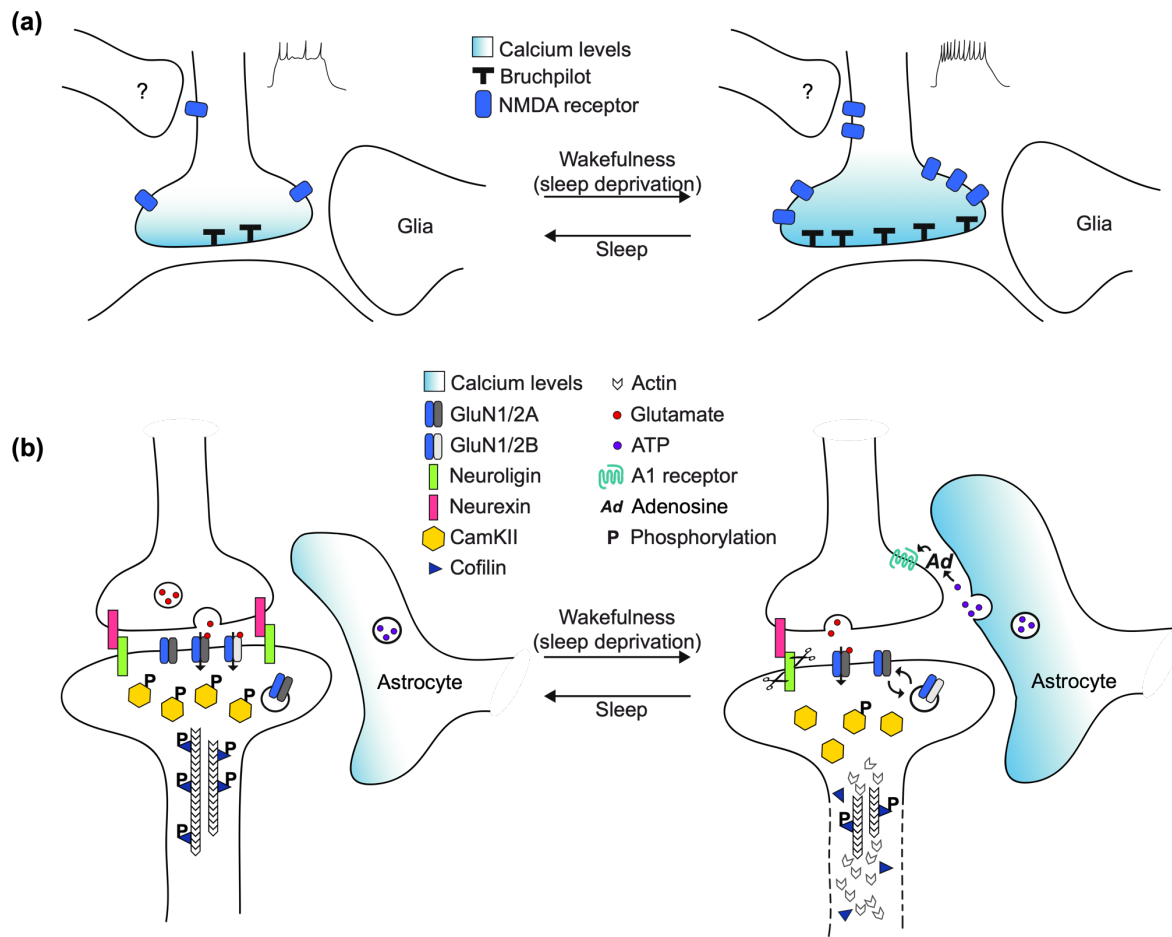
34. Grønli J, Soulé J, Bramham CR: **Sleep and protein synthesis-dependent synaptic plasticity: impacts of sleep loss and stress.** *Front Behav Neurosci* 2014, **7**:224.
35. Liu A, Zhou Z, Dang R, Zhu Y, Qi J, He G, Leung C, Pak D, Jia Z, Xie W: **Neuroigin 1 regulates spines and synaptic plasticity via LIMK1/cofilin-mediated actin reorganization.** *J Cell Biol* 2016, **212**:449-463.
36. Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, et al.: **Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroigin-1.** *Neuron* 2012, **76**:410-422.
37. El Helou J, Belanger-Nelson E, Freyburger M, Dorsaz S, Curie T, La Spada F, Gaudreault PO, Beaumont E, Pouliot P, Lesage F, et al.: **Neuroigin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:9974-9979.
38. Freyburger M, Pierre A, Paquette G, Belanger-Nelson E, Bedont J, Gaudreault PO, Drolet G, Laforest S, Blackshaw S, Cermakian N, et al.: **EphA4 is involved in sleep regulation but not in the electrophysiological response to sleep deprivation.** *Sleep* 2016, **39**:613-624.
39. Massart R, Freyburger M, Suderman M, Paquet J, El Helou J, Belanger-Nelson E, Rachalski A, Koumar OC, Carrier J, Szyf M, et al.: **The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes.** *Transl Psychiatry* 2014, **4**:e347.
40. Matsuki T, Takasu M, Hirose Y, Murakoshi N, Sinton CM, Motoike T, Yanagisawa M: **GABAA receptor-mediated input change on orexin neurons following sleep deprivation in mice.** *Neuroscience* 2015, **284**:217-224.
41. O'Callaghan EK, Ballester Roig MN, Mongrain V: **Cell adhesion molecules and sleep.** *Neurosci Res* 2016, accepted, 2016/10/28.
42. Larkin A, Chen MY, Kirszenblat L, Reinhard J, van Swinderen B, Claudianos C: **Neurexin-1 regulates sleep and synaptic plasticity in Drosophila melanogaster.** *Eur J Neurosci* 2015, **42**:2455-2466.
43. Profitt MF, Deurveilher S, Robertson GS, Rusak B, Semba K: **Disruptions of sleep/wake patterns in the stable tubule only polypeptide (STOP) null mouse model of schizophrenia.** *Schizophr Bull* 2016, **42**:1207-1215.
44. Jaaro-Peled H, Altimus C, LeGates T, Cash-Padgett T, Zoubovsky S, Hikida T, Ishizuka K, Hattar S, Mongrain V, Sawa A: **Abnormal wake/sleep pattern in a novel gain-of-function model of DISC1.** *Neurosci Res* 2016, **112**:63-69.
45. Petit JM, Magistretti PJ: **Regulation of neuron–astrocyte metabolic coupling across the sleep–wake cycle.** *Neuroscience* 2016, **323**:135-156.
46. Bjorness TE, Dale N, Mettlach G, Sonneborn A, Sahin B, Fienberg AA, Yanagisawa M, Bibb JA, Greene RW: **An adenosine-mediated glial-neuronal circuit for homeostatic sleep.** *J Neurosci* 2016, **36**:3709-3721.
47. Schmitt LI, Sims RE, Dale N, Haydon PG: **Wakefulness affects synaptic and network activity by increasing extracellular astrocyte-derived adenosine.** *J Neurosci* 2012, **32**:4417-4425.

48. Poskanzer KE, Yuste R: **Astrocytes regulate cortical state switching in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, **113**:E2675-2684.
49. Ding F, O'Donnell J, Xu Q, Kang N, Goldman N, Nedergaard M: **Changes in the composition of brain interstitial ions control the sleep-wake cycle.** *Science* 2016, **352**:550-555.
50. Yang J, Yang H, Liu Y, Li X, Qin L, Lou H, Duan S, Wang H: **Astrocytes contribute to synapse elimination via type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent release of ATP.** *Elife* 2016, **5**:e15043.
- This article used mice lacking inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 to disrupt  $Ca^{2+}$  signaling in astrocytes. It showed that this disturbance impaired the elimination of synapse of the ventral posteromedial nucleus that takes place during development. In addition, it revealed that injection of ATP or of the purinergic agonist P2Y1 rescued synapse elimination.
51. Hengen KB, Torrado Pacheco A, McGregor JN, Van Hooser SD, Turrigiano GG: **Neuronal firing rate homeostasis is inhibited by sleep and promoted by wake.** *Cell* 2016, **165**:180-191.
52. Chen Y, Akin O, Nern A, Tsui CYK, Pecot MY, Zipursky SL: **Cell-type specific labeling of synapses in vivo through Synaptic Tagging with Recombination (STaR).** *Neuron* 2014, **81**:280-293.
53. de Vivo L, Faraguna U, Nelson AB, Pfister-Genskow M, Klapperich ME, Tononi G, Cirelli C: **Developmental patterns of sleep slow wave activity and synaptic density in adolescent mice.** *Sleep* 2014, **37**:689-700.
54. Dumoulin Bridi MC, Aton SJ, Seibt J, Renouard L, Coleman T, Frank MG: **Rapid eye movement sleep promotes cortical plasticity in the developing brain.** *Sci Adv* 2015, **1**:e1500105.
55. Hines DJ, Schmitt LI, Hines RM, Moss SJ, Haydon PG: **Antidepressant effects of sleep deprivation require astrocyte-dependent adenosine mediated signaling.** *Transl Psychiatry* 2013, **3**:e212.
56. Serchov T, Clement HW, Schwarz MK, Iasevoli F, Tosh DK, Idzko M, Jacobson KA, de Bartolomeis A, Normann C, Biber K, et al.: **Increased signaling via adenosine A1 receptors, sleep deprivation, imipramine, and ketamine inhibit depressive-like behavior via induction of Homer1a.** *Neuron* 2015, **87**:549-562.

## FIGURES



**Figure 1.4. Schematic view of the impact of sleep and sleep deprivation on spine formation and density.** (a) The effect of sleep on dendritic spine formation in pyramidal neurons of the motor cortex after motor training is depicted (schematic representation of findings in [3••]). Sleep promotes spine formation on specific branches of dendrites of the apical tuft of layer V pyramidal neurons (spines newly formed represented in red), which was impaired by sleep deprivation. (b) The effect of acute sleep deprivation and sleep on dendritic spine density and dendritic branch length of hippocampal CA1 pyramidal neurons in mice (schematic representation of findings in [2••]). Sleep restores spine density and dendritic length of hippocampal neurons (spines removed by acute sleep deprivation represented in blue).



**Figure 1.5. Schematic view of effects of acute sleep loss on synaptic features that can mediate structural reorganization.** (a) Sleep deprivation was shown to increase intracellular  $[Ca^{2+}]$  via an N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR)-dependent mechanism in R2 neurons of the fruit fly, which functionally associates with increased size and number of active zones, with higher neuronal excitability (indicated by the upper traces), and also with enhanced sleep rebound during recovery (schematic representation of findings in [10•]). NMDAR could be increased either in a pre- or postsynaptic manner as depicted by a hypothetical terminal (?), and the role of glia cells in this context remains to be defined. (b) As indicated in the text, sleep deprivation was shown to impact NMDAR-mediated currents, NMDAR subunit content, synaptic adhesion proteins (e.g., Neuroligin-1), and to decrease cofilin and  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II (CamKII) phosphorylation, which are modifications shown to negatively impact dendritic spines. Increase in astrocyte intracellular  $[Ca^{2+}]$  with sleep deprivation can induce gliotransmitter release (e.g., ATP depicted) and perisynaptic astrocytic process motility. GluN1/2A: NMDAR containing subunits 1 and 2A, GluN1/2B: NMDAR containing subunits 1 and 2B (more permeable to  $Ca^{2+}$ ), ATP: adenosine triphosphate.

## 1.2 La traduction

Au niveau moléculaire, la plasticité synaptique dépendante de l'expérience induit la transcription de gènes et l'expression de protéines nécessaires à la persistance des changements synaptiques. En particulier, la synthèse protéique est requise pour le remodelage structural au niveau des épines dendritiques nécessaire à la consolidation mnésique [148,149]. La prochaine section fera un survol de la traduction protéique, en plus de discuter des principaux acteurs de sa régulation.

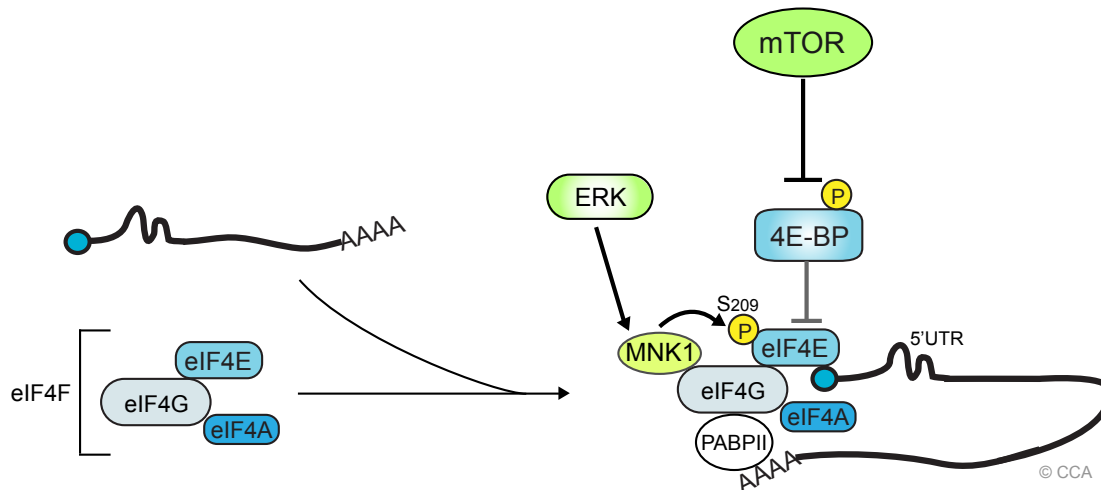
La traduction protéique peut être divisée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison [150]. Chaque étape nécessite des facteurs de traduction qui s'attachent de façon transitoire au ribosome. La traduction est le processus le plus demandant énergétiquement dans la cellule; il doit donc être finement régulé spatialement et temporellement [151]. L'initiation de la traduction se trouve à en être l'étape limitante et est une cible majeure dans le contrôle de la traduction protéique [150].

### 1.2.1 Les étapes de la traduction

Avant le début de la traduction, l'ARNm est modifié pour inclure une 7-méthylguanosine, suivie de trois groupements phosphate et d'un nucléotide X à l'extrémité 5' ( $m^7GpppX$ ), appelée coiffe 5' [152]. Avec l'ajout de résidus adénosine à l'extrémité 3', la queue poly-A [153], l'ARNm est stabilisé et peut quitter le noyau. Un complexe protéique hétérotrimérique, nommé eIF4F (*eukaryotic initiation factor 4F*), se lie à la coiffe 5' de l'ARNm (figure 1.6), permettant le recrutement subséquent du complexe de pré-initiation [150].

Le complexe eIF4F est formé de : (a) eIF4E, (b) eIF4G et (c) eIF4A (figure 1.6). eIF4E (section 1.2.2) est une protéine se liant à la coiffe 5' de l'ARNm [154], dont l'activité biologique est régulée par une famille de protéines, les 4E-BP (*eIF4E-binding proteins*; section 1.2.3) [155]. eIF4G est une protéine d'échafaudage contenant des sites de liaison pour eIF4E, eIF4A, eIF3 et PABP [155]. eIF4G s'associe à eIF3, un facteur permettant de faire la liaison avec la sous-unité 40S du ribosome [156]. Il s'associe également à la protéine PABPI (*Poly-A Binding protein I*), qui reconnaît la queue poly-A. Cela induit une formation circulaire qui rapproche la coiffe 5' et la queue poly-A, ayant pour effet de stabiliser l'ARNm et favoriser le recrutement du complexe de pré-initiation du ribosome, ce qui accélère la traduction [157]. Finalement, eIF4A est une hélicase ARN ATP-dépendante qui facilite la liaison au ribosome et son passage le long de la région 5' non-traduite (5'UTR; *5' untranslated-region*) [155].





**Figure 1.6. Représentation simplifiée du complexe d'initiation de la traduction et des protéines activatrices/inhibitrices associées.** La phosphorylation de 4E-BP (*eukaryotic initiation factor binding-protein*) par mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) permet la relâche de l'inhibition sur eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*). eIF4A (*eukaryotic initiation factor 4A*), eIF4E et eIF4G (*eIF4G : eukaryotic initiation factor 4G*) s'associent pour former le complexe eIF4F. eIF4G lie également PABPII (*poly-A-binding-protein II*) et eIF3 (non-représenté), permettant ainsi la formation circulaire de l'ARNm, en plus de lier MNK1 (*MAPK-activated protein kinase 1*). eIF4E se lie à la coiffe 5' de l'ARNm et est phosphorylé par MNK1 sur la Ser209. 5'UTR : 5'untranslated region; ERK : *extracellular signal-regulated kinase*; P : phosphate. Figure créée par CCA.

Le recrutement de la petite sous-unité (40S) du ribosome permet l'identification du codon de départ. Le complexe de pré-initiation 43S, formé de la sous-unité 40S sur laquelle est chargée l'ARN de transfert (ARNt) initial, se lie à l'ARNm près de l'extrémité 5' et scanne la 5'UTR à la recherche d'un codon AUG [155,158]. L'interaction du ribosome avec l'ARNm est facilitée par l'activité hélicase de eIF4A, qui défait les structures secondaires possiblement présentes au niveau de la 5'UTR [159]. Alors que l'activité hélicase intrinsèque de eIF4A est faible, elle peut être stimulée par son association avec eIF4F et des facteurs régulateurs comme eIF4B [160]. Le ribosome se déplace ensuite sur l'ARNm en lisant les codons. L'activité des facteurs d'élongation eEF1 et eEF2 (*eukaryotic elongation factor 1 and 2*) permet le recrutement de l'ARNt correspondant au codon afin de synthétiser la chaîne peptidique appropriée [157]. À la fin de l'élongation, lorsque le ribosome atteint un codon d'arrêt, l'ARNm est libéré. Cela permet le recyclage du ribosome, ainsi que le transport et l'utilisation de la protéine nouvellement synthétisée.

### 1.2.2 eIF4E : facteur limitant de la traduction

eIF4E est le facteur d'initiation le moins abondant dans la plupart des cellules, ce qui en fait une cible logique pour le contrôle de la traduction [161]. Trois différents mécanismes existent afin de réguler l'activité de eIF4E : (a) régulation de la transcription, (b) phosphorylation et (c) liaison à

des protéines inhibitrices (pour revue : [162]). Les prochaines sections discuteront exclusivement des mécanismes (b) et (c).

eIF4E est phosphorylé sur un seul site, la Ser<sup>209</sup>. Cette phosphorylation nécessite l'activité de la MAPK-activated protein kinase 1 (MNK1) [163] et corrèle généralement avec le taux de traduction. eIF4G agit comme port d'attache pour MNK1 et eIF4E, ce qui permet de faire le lien entre les deux protéines [164]. Puis, ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) active MNK1, ce qui promeut la phosphorylation de eIF4E. Elle solidifie l'association de eIF4E avec la coiffe 5' [165]. La phosphorylation n'affecte pas la traduction globale, mais régulerait plutôt la synthèse de certaines protéines spécifiques, notamment celles issues d'un ARNm avec une longue région 5'UTR [166] qui contient possiblement d'importantes structures secondaires et par conséquent plus sensibles à la présence de eIF4E. En effet, la présence de structures secondaires nécessite une activité augmentée de eIF4A, l'hélicase, afin de dénouer l'ARNm et permettre le passage du ribosome [159]. Plus de eIF4E permet la formation d'un plus grand nombre de complexes eIF4F [161].

Au niveau du cerveau, plusieurs stimuli peuvent induire la phosphorylation de eIF4E. Aux synapses de la région CA1 de l'hippocampe, l'activation des récepteurs N-Methyl-D-aspartate (NMDA) induit l'activation de MNK1 et la phosphorylation de eIF4E [167]. Des résultats complémentaires ont montré que l'induction de la LTP nécessite la traduction régulée par la phosphorylation concomitante de eIF4E (via la signalisation de ERK) et de 4E-BP1 (via mTORC1) [168]. Cependant, la mutation de eIF4E chez la souris ne récapitule pas le phénotype, puisque l'apprentissage dépendant de l'hippocampe et la LTP à long terme (L-LTP) sont intacts [166]. Également, l'activité de eIF4E semble être modulée par le sommeil et les rythmes circadiens. Dans les NSC, il a été montré que la lumière induit la phosphorylation de eIF4E, et que celle-ci oscille de façon circadienne en condition constante [169]. De plus, cette phosphorylation module le rythme circadien chez la souris, en régulant la synthèse protéique du gène de l'horloge PER [169]. Finalement, la privation de sommeil diminue la phosphorylation de eIF4E dans le gyrus denté, mais pas dans la région CA1 de l'hippocampe [170].

Le troisième mécanisme de régulation se fait via des protéines inhibitrices, qui séquestrent eIF4E, empêchant ainsi la formation du complexe eIF4F. Ces protéines sont discutées à la section 1.2.3.

### 1.2.3 Répresseurs de la traduction 4E-BP1 et 4E-BP2

L'interaction entre eIF4G et eIF4E est inhibée par les 4E-BP, aussi connus sous le nom de PHAS (*phosphorylated heat and acid soluble protein stimulated by insulin*). Les 4E-BP préviennent l'association entre ces deux protéines en séquestrant eIF4E [171]. Pour ce faire, ils se lient au même motif de liaison que eIF4G (YXXXXLΦ, où Φ est un acide aminé hydrophobe et X représente n'importe quel acide aminé) [172]. La liaison de eIF4E aux 4E-BP n'empêche pas sa liaison à la coiffe 5' [173,174], mais plutôt sa liaison à eIF4G. Leur association avec eIF4E est donc mutuellement exclusive [175]. Sans la liaison eIF4E-eIF4G, il n'y a pas de formation du complexe eIF4F [171]. Le ribosome ne peut donc être recruté par des mécanismes dépendants de la coiffe [155] et la traduction s'en trouve réduite. Le lien 4E-BP-eIF4E est réversible et change selon les conditions du milieu [176].

Trois protéines 4E-BP ont été identifiées chez les mammifères : 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 [173,174], encodées par les gènes *Eif4ebp1*, *Eif4ebp2* et *Eif4ebp3*. Les 4E-BP sont des petites protéines de 117, 120 et 101 acides aminés, respectivement. Chez la souris, 4E-BP1 et 4E-BP2 partagent 56% d'identité, et 4E-BP1 et 4E-BP3 partagent 57% d'identité [173,174]. La conservation des acides aminés est la plus grande au niveau de la région contenant le site de liaison à eIF4E [172]. Les quatre premiers sites de phosphorylation sont également conservés entre les trois isoformes [173] (Figure 1.7). Malgré le fait que ces protéines aient apparemment des fonctions moléculaires identiques, leur expression tissulaire diffère. *Eif4ebp1* est très exprimé dans les muscles squelettiques, le pancréas et les tissus adipeux [177], ainsi que dans les NSC comparativement aux autres régions du cerveau (cervelet, hippocampe, etc) [178]. D'autres études ont démontré la présence de 4E-BP1 dans les neurones et les cellules gliales des ganglions de la corne dorsale de la moelle épinière [179,180], dans la zone sous-ventriculaire, mais pas dans les neuroblastes [181], et dans les interneurons hippocampiques [182]. Dans le neurone, *Eif4ebp1* et sa protéine seraient exprimés surtout dans le noyau et un peu aux dendrites [183]. Aussi très exprimé dans le reste du corps, 4E-BP2 prédomine dans le cerveau [184] et les lymphocytes [185]. Dans les neurones de l'hippocampe, il a une distribution somatodendritique et est enrichi au niveau post-synaptique comparativement à 4E-BP1 [186]. *Eif4ebp3* est retrouvé de façon importante dans les muscles squelettiques, le cœur, les reins et le pancréas, mais n'est que très peu exprimé dans le cerveau [173]. La protéine est présente dans le colon, les reins, le foie et le tissu adipeux [187]. Les mécanismes régulateurs et les fonctions moléculaires de cette protéine sont moins étudiés.

m-4E-BP1	1	--MSAGSSCSQTPSRAIP	TRRVALGDGVQLPPGDYST	TPGGTLFST	TPGGTRII	52
m-4E-BP2	1	MSASAGGSHQPSQSRAIP	TRTVAISDAAQLP-QDYCT	TPGGTLFST	TPGGTRII	53
m-4E-BP3	1	--MSSSTSC-----PIP-----	GCRDQLPDGYST	TPGGTLYAT	TPGGTRII	39
		*◇ *	** ◇	* *****◇*****		

m-4E-BP1	53	YDRKFLMECRNS	SPVAK	TPPKDLPAIPGVT	SPTSDEPPMQASQS--QLPS	SPEDK	104
m-4E-BP2	54	YDRKFLDDRNS	SPMAQT	TPPCHLPNIPGVT	SPGALIEDSKVEVNNLNNLN	NNHDRK	107
m-4E-BP3	40	YDRKFLLECKNS	SPIAR	TPPCCLPQIPGVT	TLPAVPP-SKLELL----	KEQKQTE	88
		*****◇ ◇***◇◇***	** *****◇ ◇	◇ ◇		◇ ◇	

m-4E-BP1	105	RAGGEESQ	FEMDI	117
m-4E-BP2	108	HAVGDEAQ	FEMDI	120
m-4E-BP3	89	VEITDDEQ	FEMDM	101
		◇◇ *****◇		

**Figure 1.7. Alignement des séquences protéiques des trois 4E-BP chez la souris: 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3.** Les acides aminés identiques sont indiqués par l'astérisque (\*) et les acides aminés conservés sont indiqués par le losange (◇). Les sites de phosphorylation sont marqués en vert. Les acides aminés impliqués dans la liaison à eIF4E sont montrés en mauve. Les asparagines déamidées sont montrées en bleu pâle. Les motifs RAIP et TOS (*mTOR signaling*) sont indiqués en rose et en jaune, respectivement. Figure créée par CCA. Séquences protéiques tirées de UniProtKB : <https://www.uniprot.org/>.

L'expression des 4E-BP diverge dans les différents organes. Cela suggère que la régulation de eIF4E est modulée différemment selon les tissus et est dépendante de l'abondance relative de chaque 4E-BP. Puisque les 4E-BP partagent des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles, il est possible que leur activité dans un tissu ou un type cellulaire spécifique soit régulée par des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation. En effet, la phosphorylation de sérines et thréonines spécifiques sur les 4E-BP module leur affinité pour eIF4E [157]. La phosphorylation par la kinase mTOR (*mechanistic target of rapamycin*; section 1.2.4) inactive les 4E-BP, ce qui empêche leur interaction avec eIF4E, favorisant ainsi la traduction. La prochaine section discutera des modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité des 4E-BPs. 4E-BP1 a fait l'objet de recherches plus importantes, alors que peu d'informations sont disponibles sur le reste de la famille protéique (pour revue voir [176]).

### 1.2.3.1 Régulation par la phosphorylation

#### 4E-BP1

Sept sites de phosphorylation ont été identifiés chez l'humain pour 4E-BP1 : Thr<sup>36</sup>, Thr<sup>45</sup>, Ser<sup>64</sup>, Thr<sup>69</sup>, Ser<sup>82</sup>, Ser<sup>100</sup> Ser<sup>111</sup> (+1 pour les sites chez l'humain) (Figure 1.7). Les quatre premiers sites énumérés sont connus pour être régulés via des voies de signalisation. Ils sont conservés

entre les espèces, en plus de se retrouver chez les autres 4E-BP [173]. La phosphorylation des trois autres sites ne semble pas régulée. En culture cellulaire, les sites 36 et 45 seraient phosphorylés préférentiellement, leur phosphorylation étant nécessaire pour que Thr<sup>69</sup> soit phosphorylé, qui lui-même étant nécessaire pour la phosphorylation de Ser<sup>64</sup> [188]. Une hiérarchisation différente a été observée en analysant du tissu cortical [189]. La sensibilité à la rapamycine des différents sites varie et est controversée selon la littérature : les Ser<sup>64</sup> et Thr<sup>69</sup> sont très sensibles [188], alors que la phosphorylation des Thr<sup>36</sup>/Thr<sup>45</sup> semble peu affectée, quoique certaines études ont montré le contraire [190,191]. La phosphorylation de Thr<sup>36</sup>/Thr<sup>45</sup> ne régule pas la liaison de 4E-BP1 avec eIF4E, puisque cette liaison entre les deux est toujours possible [157]. Ce serait plutôt les phosphorylations de Ser<sup>64</sup> et de Thr<sup>69</sup> qui réguleraient la liaison à eIF4E [157]. Il est évident que la phosphorylation est complexe, et que les données sont incomplètes, surtout en ce qui a trait à la régulation *in vivo*.

Deux motifs d'acides aminés, nommés motifs TOS (*mTOR signaling*) et RAIP (nom correspondant à la séquence d'acides aminées), modulent la phosphorylation (Figure 1.7). Le motif TOS, situé du côté C-terminal de la protéine, est nécessaire pour la liaison à Raptor (*regulatory protein associated with mTOR*; section 1.2.4) [192], ce qui permet la phosphorylation des Ser<sup>64</sup>/Thr<sup>69</sup> de 4E-BP1/2/3 [193]. La phosphorylation de Thr<sup>36</sup>/Thr<sup>45</sup> dépendrait plutôt du motif RAIP situé au N-terminal, seulement présent chez 4E-BP1 et 4E-BP2 [194,195]. En effet, 4E-BP3 serait faiblement phosphorylé dû à l'absence de ce motif [173,195]. Il semble aussi que 4E-BP1 peut être phosphorylé par plusieurs autres kinases, notamment CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) [196] et GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 beta*) [197,198]. Ainsi, la présence d'une phosphorylation hiérarchisée, qui dépend de deux motifs distincts et qui pourrait être effectuée par plusieurs kinases différentes suggèrent une régulation complexe de 4E-BP1 et des autres 4E-BP pouvant influencer différemment leur activité.

## 4E-BP2

La phosphorylation hiérarchique de 4E-BP1 semble conservée chez 4E-BP2. Trois bandes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) sont apparentes sur le gel lors de la migration, indiquant plusieurs isoformes [187]. La forme de migration la plus lente est cependant spécifique au cerveau [199]. Dans cet organe, 4E-BP2 subit une autre modification post-traductionnelle, soit la déamidation, qui correspond à la conversion d'une asparagine (N) en une aspartate (D) [199]. Durant les deux premières semaines post-natales, la phosphorylation de 4E-BP2 aux sites Thr<sup>36</sup> et Thr<sup>45</sup> diminue rapidement. Parallèlement, les formes *déamidées* apparaissent [199]. Puisque la forme *déamidée* a une association réduite avec eIF4E et une association augmentée avec Raptor, elle ne réprime que faiblement la traduction. Il n'est cependant pas clair si les autres sites continuent d'être

phosphorylés. Plusieurs études qui regardent la phosphorylation de 4E-BP2, notamment dans le cerveau, utilisent un anticorps ciblant les sites Thr<sup>36</sup> et Thr<sup>45</sup> [200-202]. Considérant la très grande similarité des séquences entre 4E-BP1 et 4E-BP2, ainsi que la perte de phosphorylation aux sites Thr<sup>36</sup> et Thr<sup>45</sup> en post-natal, il est possible l'utilisation de cet anticorps ne permette que de détecter la phosphorylation de 4E-BP1.

### 1.2.3.2 Rôles des répresseurs de la traduction

4E-BP1 a été très étudié d'un point de vue oncologique; de hauts niveaux de phosphorylation de 4E-BP1 sont objectivés dans la plupart des cancers, et ont été associés à un pronostic plus faible [203]. Cependant, très peu d'études se sont penchées sur son rôle potentiel au niveau du cerveau. Au niveau des NSC, la phosphorylation de 4E-BP1 est régulée par mTORC1 de façon circadienne [178]. À son tour, 4E-BP1 contrôle l'horloge circadienne via la régulation de la traduction du vasopeptide intestinal (VIP; *vasoactive intestinal polypeptide*). VIP est un neuropeptide essentiel au couplage et à la synchronie des neurones des NSC [204]. Également, 4E-BP1 semble jouer un rôle dans la nociception, car les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> ont une sensibilité augmentée à la douleur mécanique [179]. De plus, dans la moelle épinière, ces souris présentent une transmission excitatrice basale augmentée et un seuil abaissé pour l'induction de la potentialisation [179].

L'absence de 4E-BP2 résulte en une transmission synaptique basale facilitée dans les cellules pyramidales de l'hippocampe [199,205], par la traduction spécifique des sous-unités GluA1 et GluA2 du récepteur AMPA ( *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) [205]. Appuyant ces données, un groupe a montré que l'inhibition du récepteur GABA<sub>B</sub> diminue l'activité de mTORC1 et réduit l'expression de GluA1 [206]. L'augmentation de la fréquence, qui est un reflet de la relâche présynaptique, des courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSC; *miniature excitatory postsynaptic current*) dans les neurones 4E-BP2<sup>-/-</sup> [205] indique que cette protéine jouerait un rôle au niveau présynaptique, malgré son enrichissement postsynaptique [186]. Une mutation inactivant 4E-BP2 résulte en une facilitation de l'induction de la L-LTP dans les cellules pyramidales de l'hippocampe [184]. En effet, une seule stimulation haute fréquence, qui induit normalement une LTP de courte durée (E-LTP; *early LTP*) chez les souris sauvages, produit une L-LTP chez les souris 4E-BP2<sup>-/-</sup>. Associé à cela, les souris mutantes pour 4E-BP2 présentent des déficits d'apprentissage [184,207] ainsi que des comportements de type autistique [208,209] qui seraient causés par l'absence de *Eif4ebp2* uniquement dans les interneurones GABAergiques, mais pas au niveau des neurones glutamatergiques ni des astrocytes [210]. La LTD (LTD; *long-term depression*) médiée par les mGluR est également facilitée chez ces souris [211] et son inhibition renverse les comportements autistiques [209]. De plus, 4E-BP2 semble important pour la

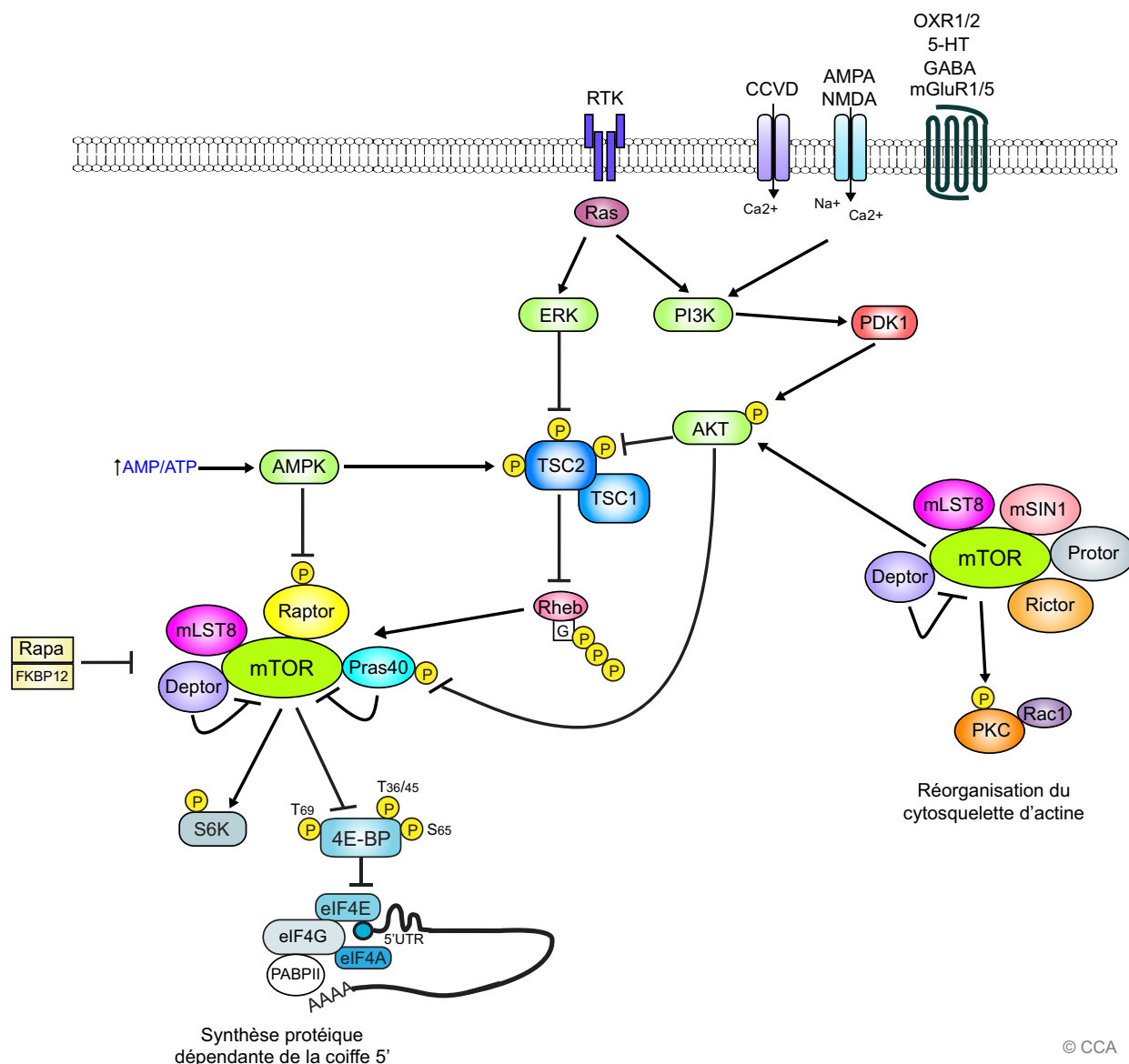
régulation des épines dendritiques, puisque la perte de *Eif4ebp2* altère la structure neuronale; elle augmente la densité des épines des neurones pyramidaux de l'hippocampe [205,208].

### 1.2.4 mTOR

mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) est une protéine serine/thréonine kinase, dans la famille des kinases reliées aux phosphatidylinositol 3-kinases (PI3KK) [212]. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules eucaryotes. Le gène *mtor* est essentiel au développement du cerveau [213]. Une mutation homozygote du gène *mtor* est létale chez les souris, empêchant le développement embryonnaire après E5.5 [214].

La protéine mTOR forme la sous-unité catalytique de deux complexes protéiques indépendants, mTORC1 et mTORC2, ayant des activités métaboliques différentes (Figure 1.8) [212]. En plus de mTOR, les deux autres protéines centrales du complexe mTORC1 sont Raptor (*regulatory protein associated with mTOR*) [215] et mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*) [216]. Raptor est une protéine régulatrice nécessaire à l'activité du complexe; elle facilite le recrutement de substrats et est essentielle à une localisation cellulaire appropriée [192,215]. En plus de ses trois composantes centrales, mTORC1 contient deux sous-unités inhibitrices, Pras40 (*proline-rich Akt substrate of 40kDa*)[217] et DEPTOR (*DEP domain containing mTOR interactin protein*)[218]. mTOR a été découvert suite à la découverte de la rapamycine, un agent antimicrobien ayant des propriétés anti-fongiques, anti-tumorales et immunosuppressives [219,220]. Rapamycine forme un complexe actif en se liant à l'isomérase FKBP12 et inhibe directement mTORC1 [221]. Inversement, mTORC2 est dit insensible à la rapamycine [222]. Beaucoup moins étudié que son cousin, mTORC2 est aussi formé de la kinase mTOR et de mLST8. Au lieu de Raptor, mTORC2 contient Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), une protéine non reliée ayant une fonction analogue [222]. mTORC2 contient lui aussi la protéine inhibitrice DEPTOR, en plus des sous-unités régulatrices mSin1 (*mammalian stress-activated Map kinase-interacting protein 1*) et Protor1/2 (*protein observed with Rictor 1 and 2*) (Figure 1.8) [212].

mTORC1 est un senseur des nutriments (glucose, acides aminés, oxygène et ATP, facteurs de croissances, neurotransmetteurs), lui permettant de contrôler diverses fonctions cellulaires comme les métabolismes énergétique, lipidique et mitochondrial, la synthèse protéique et l'autophagie [223]. Il régit donc la balance entre les processus anaboliques et cataboliques cellulaires en réponse aux conditions environnementales. Ainsi, lorsque les conditions sont favorables (i.e. en présence de nutriments), mTORC1 fait passer le métabolisme cellulaire du mode catabolique vers l'anabolisme. mTORC2 est insensible au statut nutritif, mais sensible aux facteurs de croissance; il régule donc la survie et prolifération cellulaire, ainsi que l'apoptose [224].



**Figure 1.8. Voies neuronales menant à l'activation de *mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1)* et mTORC2 ainsi que leurs effecteurs.** L'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTK), ainsi que des canaux calciques voltage dépendant (CCVD), des récepteurs N-Méthyl-D-aspartate (NMDA) et  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid (AMPA) et des récepteurs métabotropiques convergent vers le complexe protéique *tuberous sclerosis complex* (TSC1/2) et induit sa phosphorylation via différentes kinases comme la protéine kinase B (AKT) et *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). L'inactivation résultante de TSC1/2 mène à une augmentation de la concentration de *Ras homolog enriched in brain* (Rheb), l'activateur principal de mTORC1. mTORC1 sent le statut métabolique de la cellule via l'AMP kinase (AMPK). Le complexe FKBP12 et rapamycine (Rapa) inhibe mTORC1. 4E-BP : *eukaryotic initiation factor binding-protein*; 5-HT : sérotonique; 5'UTR : *5'untranslated region*; DEPTOR : *DEP domain containing mTOR interactin protein*; eIF4A : *eukaryotic initiation factor 4A*; eIF4E : *eukaryotic initiation factor 4E*; eIF4G : *eukaryotic initiation factor 4G*; G : guanosine; GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique; mGluR1/5 : récepteur métabotrope glutamatergique 1/5; mLST8 : *mammalian lethal with Sec13 protein 8*; mSin1 : *mammalian stress-activated Map kinase-interacting protein 1*; OXR1/2 : récepteur à orexine 1/2; P : phosphate; PABPII : *poly-A-binding-protein II*; PKC : protéine kinase C; Pras40 : *proline-rich Akt substrate of 40kDa*; Protor1/2 : *protein observed with Rictor 1 and 2*; Raptor : *regulatory protein associated with mTOR*; Rictor : *rapamycine insensitive companion of mTOR*; S6K : *p70 ribosomal S6 protein kinase*. Figure créée par CCA.



### 1.2.5 Voies activatrices/inhibitrices de mTORC1

La majorité des voies qui contrôlent l'activité de mTORC1 convergent vers *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC), qui est un complexe régulateur inhibiteur de mTORC1 [225]. Inversement, le complexe TSC est nécessaire pour l'activation de mTORC2 [226]. Ce complexe hétérotrimérique est composé des suppresseurs de tumeur TSC1 (hamartin), et TSC2 (tuberin), ainsi que de TBC1D7. TSC inactive la GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) en changeant son statut nucléotidique (hydrolyse de GTP en GDP). La Rheb-GDP ne peut donc plus lier mTORC1 et l'activer [227]. L'activation de récepteurs tyrosine kinase (RTK), de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et de récepteurs canaux induit, via l'activation de kinases spécifiques (ERK et protéine kinase B (AKT)), la phosphorylation de TSC1/2 et son inactivation subséquente. TSC ne peut donc plus hydrolyser Rheb et la concentration de Rheb-GTP augmente. Rheb-GTP peut maintenant activer mTORC1 en interagissant avec la kinase mTOR [228]. Dans le neurone, BDNF, IGF-1 (*insulin-like growth factor*) et VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sont les principaux facteurs de croissance qui activent mTORC1 via leurs RTK (Figure 1.8). L'action de BDNF sur son récepteur induit la phosphorylation de TSC2, ce qui enlève l'inhibition sur mTORC1 [229]. Ainsi, BDNF lie la synthèse protéique locale à la plasticité synaptique via l'activation de mTOR. Dans les RCPG connus pour activer mTORC1, on trouve notamment les mGluR1/5 (senseur de l'homéostasie du sommeil) [211], les récepteurs dopaminergiques D<sub>1</sub> [230,231] et D<sub>3</sub> [232], sérotoninergique 5-HT<sub>6</sub> [233], GABA<sub>B</sub> [206] et orexinergiques OXR1 et OXR2 [234,235]. Peu d'études se sont intéressées à la convergence entre la signalisation orexinergique et mTOR, mais il semble que l'activation des récepteurs résulte en une activation rapide de mTORC1 [235], dont le mécanisme est inconnu dans le cerveau. Considérant l'importance de mTOR dans les fonctions de l'hypothalamus [236-238], et la position anatomique des neurones à ORX, il est logique que ces voies convergent.

Une kinase qui régule négativement mTOR est l'AMPK. Cette kinase fonctionne comme un senseur du statut métabolique de la cellule; elle est activée par un ratio AMP/ATP augmenté. Les niveaux d'AMP sont inversement proportionnels aux niveaux d'ATP. Suite à son activation, AMPK phosphoryle et active TSC2, ce qui inhibe mTOR [239]. Elle inhibe aussi directement mTORC1 en phosphorylant Raptor [240]. Lorsque l'énergie cellulaire est basse (i.e. ratio AMP/ATP élevé), mTOR est inhibé, limitant l'activation des voies anaboliques, comme la synthèse protéique. Par exemple, une privation de sommeil augmente les niveaux d'AMPK [52,200] et diminue l'activité de mTORC1 en induisant sa dissociation de Raptor, impactant négativement la synthèse protéique [200]. Dans les premières heures de sommeil, les régions du cerveau qui ont été activées en éveil présentent une augmentation de la production d'ATP, ce qui diminue les niveaux d'AMPK [126].

Dans ces mêmes régions, la production d'ATP corrèle positivement avec l'intensité de l'activité delta en NREM [126]. Cela suggère que l'augmentation d'ATP induite par le sommeil et l'inactivation subséquente d'AMPK favorise les processus anaboliques durant le sommeil, par une activité augmentée de mTORC1 en sommeil. Cela est conséquent avec l'augmentation de la traduction protéique en sommeil et son inhibition lors d'une privation de sommeil [200,241-243].

Les données pour mTORC2 sont limitées. On sait que plusieurs récepteurs à facteur de croissance vont activer mTORC2. Son inhibition serait une conséquence de l'hyperactivation de mTORC1 [224].

### 1.2.6 Voies de signalisation

Les voies de signalisation en aval de mTORC1 bifurquent vers deux voies qui gouvernent chacune la traduction de transcrits spécifiques. mTOR régule la traduction protéique via deux substrats, les protéines kinase S6 ribosomale p70 (S6K1/2; *p70 ribosomal S6 protein kinase 1 and 2*) et les 4E-BP. mTORC1 phosphoryle directement S6K1 sur un seul site, qui en retour va phosphoryler et activer plusieurs substrats qui favorisent l'initiation de la traduction, notamment eIF4B, un régulateur positif du complexe eIF4F [244] et BMAL1 [245]. Également, comme décrit plus haut, mTORC1 phosphoryle les 4E-BPs sur plusieurs sites, favorisant la relâche de eIF4E et l'initiation de la traduction. Malgré le fait que mTORC1 contrôle la synthèse protéique globale en régulant l'assemblage de eIF4F, il stimule préférentiellement la traduction d'un groupe d'ARNm, notamment ceux possédant une région 5'UTR longue et structurée, comme décrit à la section 1.2.2. Dans le cerveau, *Neurologin-1* et -2 [208], et *Per1* et 2 [169] sont des exemples de transcrits régulés par leur région 5'UTR. Un autre groupe d'ARNm qui serait régulé par mTORC1 sont les transcrits encodant des protéines ribosomales et des facteurs d'élongation, les ARNm TOP (*5' terminal oligopyrimidine tract*). Ces TOP consistent en cinq à 15 pyrimidines adjacentes à la coiffe 5', et sont nécessaires pour une coordination de la traduction [246].

mTORC2 phosphoryle et active plusieurs kinases (AKT, PKC) qui régulent entre autres la survie cellulaire, la croissance, la progression du cycle cellulaire et la migration cellulaire [224]. Conséquemment, une fonction importante de ce complexe est la régulation de la polymérisation de l'actine via l'activation de PKC et Rac1 [222]. Dans les neurones, cette fonction est essentielle pour la plasticité synaptique, et ainsi la consolidation de la mémoire à long terme [247].

### 1.2.7 Rôles cellulaires

Dans le système nerveux central, mTOR régule différentes fonctions, incluant l'apprentissage et la mémoire, les rythmes circadiens, la plasticité synaptique, la synthèse protéique

au niveau des dendrites et la formation de l'arbre dendritique. Sa surexpression ou son inactivation sont délétères pour le cerveau, comme en témoignent les nombreuses mTOR-opathies [213]. Les paragraphes suivants survoleront quelques fonctions de mTOR dans le cerveau.

#### **1.2.7.1 Horloge circadienne**

L'étude des voies de signalisation qui sous-tendent l'entraînement photique des NSC a montré que l'exposition à lumière durant la nuit subjective active S6K1 en induisant sa phosphorylation, et qu'elle augmente la phosphorylation de 4E-BP1 aux Thr<sup>36</sup> et Thr<sup>45</sup> [248,249], deux processus découlant de l'activation de mTORC1. mTORC1 promeut la traduction de VIP via 4E-BP1 [178]. Conséquemment, Liu et collègues [250] ont montré que l'activation de mTORC1 par la lumière est importante pour la synchronisation de l'horloge, et que ces effets sont dépendants de la signalisation VIP. De plus, mTORC1, via son effecteur S6K1, phosphoryle BMAL1 et promeut la rythmicité de la synthèse protéique [245]. Ainsi, la signalisation rythmique de mTOR semble contribuer à la synchronicité des oscillateurs circadiens périphériques avec l'horloge centrale.

#### **1.2.7.2 mTOR-opathies**

L'hyperactivation de mTORC1 a été observée dans diverses pathologies neuro-développementales, comme la sclérose tubéreuse de Bourneville (mutation de TSC1 ou TSC2), le syndrome du X fragile et l'hémimégalencéphalie. Ces maladies sont caractérisées par une perte de l'organisation des couches corticales, des neurones dysplasiques ainsi qu'une hypertrophie neuronale et gliale [213]. De nombreux signaux extracellulaires convergent sur mTORC1 pour réguler le renouvellement et la différenciation des cellules souches neurales à différents moments du développement du cerveau. De façon conséquente, l'hyperactivation de mTORC1 induit la différenciation des cellules souches neurales en cellules progénitrices hautement prolifératives, via l'inhibition des 4E-BP [181]. De plus, cette suractivation entraîne une mauvaise migration des neurones au niveau du cortex, via une augmentation de la traduction dépendante de la coiffe, démontrant l'importance de cette voie pour le développement cortical [251].

mTOR serait également impliqué dans plusieurs cas du troubles du spectre de l'autisme (TSA) [252]. Les TSA sont un regroupement de troubles neuro-développementaux qui se définissent par des déficits de communication et d'interaction sociale ainsi que des comportements répétitifs et des intérêts circonscrits. Les enfants et les adultes présentant un TSA souffrent également de troubles du sommeil [253,254]. Les causes de l'autisme sont très hétérogènes, mais la prévalence élevée des TSA dans les mTOR-opathies suggère que la régulation de la synthèse protéique serait une variable critique dans le développement de l'autisme. Plusieurs études animales ont permis de corroborer les observations faites chez l'humain. Les souris *Tsc1<sup>+/-</sup>* et

*Tsc2*<sup>+/-</sup> ont un déficit d'interaction sociale [255] et les *4E-BP2*<sup>-/-</sup> présentent un phénotype s'apparentant à l'autisme [208], démontrant l'implication de la synthèse protéique dépendante de mTORC1. L'absence de *Eif4ebp2* chez les souris augmente la traduction des neuroligines (NLGN), protéines qui régulent la transmission glutamatergique et qui ont été associées à quelques cas d'autisme chez les humains [256,257]. De façon intéressante, la suppression de l'expression de *Nlgn1* a renversé partiellement le phénotype autistique observé chez l'animal [208].

### 1.2.7.3 Plasticité synaptique

La L-LTP nécessite une augmentation locale de la synthèse protéique en réponse à l'activité synaptique [258]. Comme mentionné précédemment, eIF4E et 4E-BP1/2 sont nécessaires pour une expression normale de la LTP [168,184]. De plus, l'activation de mTORC1, par différents paradigmes de stimulation (forskolin, stimulation électrique, agonistes mGluR), participe à la plasticité synaptique en augmentant localement la disponibilité des facteurs de traduction [148]. Inversement, l'utilisation de rapamycine diminue la L-LTP de façon importante [186]. mTORC1 a également été impliqué dans la LTD, une plasticité synaptique caractérisée par une diminution de l'efficacité synaptique. Une forme de LTD, celle dépendante des mGluR (mGluR-LTD), est bloquée par la rapamycine [259]. En effet, l'activation des mGluR augmente la signalisation ERK-MAPK [260] et PI3K-mTOR [211], menant à une synthèse protéique augmentée dans les dendrites. Il appert qu'une suractivation de mTORC1 cause les mêmes déficits, puisque l'absence de *Tsc1* dans la région CA1 de l'hippocampe abolit la mGluR-LTD [261]. Conséquemment, puisque la LTP est le corrélat cellulaire qui sous-tend la mémoire [262], la consolidation et reconsolidation de différents types de mémoire nécessitent aussi l'activité de mTORC1 [263,264]. Ces évidences démontrent l'importance de la régulation de mTORC1 et de ses effecteurs dans la plasticité synaptique et la mémoire dépendantes de la synthèse protéique.

## 1.3 Lien entre le sommeil et la traduction

Le sommeil et la privation de sommeil modifient de façon bi-directionnelle les voies de signalisation moléculaires qui régulent la force synaptique et contrôlent la transcription et la traduction de transcrits nécessaires à la plasticité. Nous savons depuis longtemps que la synthèse protéique est augmentée en sommeil [242,243].

Cinq pour cent des transcrits corticaux cérébraux seraient modulés par l'éveil/le sommeil [265]. De ces ARNm, ceux encodant la machinerie de traduction protéique sont généralement augmentés en sommeil et diminués en éveil [125,265]. De façon similaire, une privation de sommeil diminue la transcription des gènes impliqués dans la régulation de la traduction, notamment dans

l'hippocampe [266]. Inversement, les gènes encodant les facteurs de transcription sont augmentés en privation de sommeil [266]. Ainsi, un éveil cortical prolongé semble altérer la consolidation mnésique en réduisant la synthèse de protéines qui supportent la plasticité synaptique et la mémoire. Plusieurs études abondent en ce sens. Seibt et collègues [267] ont montré que la consolidation de la plasticité de dominance oculaire (ODP; *ocular dominance plasticity*), nécessitait la synthèse protéique en sommeil. L'ODP est une plasticité *in vivo* qui réfère aux changements physiologiques et structuraux dans les circuits visuels corticaux induits par une privation monoculaire. Une période de sommeil d'une heure (mais pas de six heures) augmente la phosphorylation de 4E-BP1 préférentiellement à la synapse [241], indiquant la nécessité pour la plasticité d'une synthèse protéique localement et temporellement régulée. Dans la même veine, des déficits mnésiques induits par la perte de sommeil sont dus à un manque de synthèse protéique dans l'hippocampe, par altération de la voie mTORC1 spécifiquement [200]. Cette dernière étude montre également que la phosphorylation de 4E-BP2 est réduite suivant une période d'éveil forcé. Considérant les sites de phosphorylation identiques entre 4E-BP1 et 4E-BP2, ainsi que la déamidation de 4E-BP2 en post-natal [199], il est probable que l'anticorps ait détecté 4E-BP1. Cependant, puisque la voie S6K n'est pas modifiée par la privation de sommeil [200], nous pouvons affirmer que les changements passent par la voie 4E-BP. Ainsi, mTORC1 serait préférentiellement activé en sommeil, pour promouvoir la synthèse protéique et consolider la mémoire.

Malgré le support considérable pour un rôle modulateur du sommeil sur les mécanismes contrôlant la traduction et ses fonctions régulées, peu de données sont connues sur le potentiel rôle de la machinerie de synthèse protéique dans la régulation de l'éveil et du sommeil. Cependant, considérant le rôle de la machinerie de traduction protéique dans la synchronisation des oscillations circadiennes [169,178,245,250] et dans la plasticité synaptique liée à l'activité neuronale [184,241], ainsi que le rôle des NSC dans la régulation du sommeil [113,118], nous sommes en droit de penser que la machinerie pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation du sommeil. La voie mTORC1-4E-BP1-eIF4E régule la traduction des gènes de l'horloge *Per1* et *Per2* par leur région 5'UTR [169] et les transcrits de ces mêmes gènes sont augmentés après privation de sommeil [73,74]. Même si aucune démonstration de l'altération au niveau protéique n'a été faite, ces données montrent un lien entre l'homéostasie du sommeil et les protéines 4E-BP1 et 4E-BP2.

D'autres évidences laissent sous-entendre que les répresseurs traductionnels pourraient jouer un rôle dans la régulation du sommeil. Une augmentation de l'expression de VIP est observée dans les NSC chez les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> [178]. Comme VIP est retrouvé dans d'autres régions du cerveau, notamment dans le tronc cérébral où se trouve plusieurs noyaux impliqués dans la régulation du sommeil, dans le cortex cérébral et l'hippocampe [268], il n'est pas impossible que sa

traduction y soit également régulée par la voie mTOR. VIP influence la quantité d'éveil et de sommeil selon le temps du jour, car les souris VIP<sup>-/-</sup> présentent plus de SLP et de SP durant la nuit [269,270]. Également, VIP modifie le patron de décharge des neurones thalamocorticaux en supprimant les oscillations intrathalamiques [271,272]. Cela favorise une activité tonique associée à l'éveil et au SP. Ainsi, 4E-BP1 et 4E-BP2 sont en mesure de modifier la traduction de VIP dans le but de changer l'activité corticale.

## Chapitre 2 – Objectifs et hypothèses

Compte tenu de l'impact à la fois du sommeil et de la privation de sommeil sur la traduction protéique, et du manque d'études concernant un possible impact de la machinerie de traduction protéique dans la régulation du sommeil, nous avons voulu étudier le rôle des répresseurs de la traduction 4E-BP1 et 4E-BP2 dans la régulation du sommeil et de l'éveil. 4E-BP1 est impliqué dans le rythme circadien [178] et 4E-BP2 est important pour une plasticité synaptique normale dans l'hippocampe, ainsi qu'une mémoire normale [184,207]. Il semble donc intuitif de croire qu'ils pourraient jouer un rôle dans la régulation du sommeil. Le but de la présente étude est de trouver si 4E-BP1 et 4E-BP2 possèdent un rôle dans l'architecture et l'activité EEG du sommeil et de l'éveil.

### 2.1 Objectifs

Les objectifs de cette étude sont les suivants : (a) Déterminer l'impact de l'absence de 4E-BP1 et 4E-BP2 sur l'architecture du sommeil et l'activité EEG; (b) Déterminer la contribution des deux inhibiteurs de la traduction dans la réponse EEG et moléculaire à la privation de sommeil.

### 2.2 Hypothèses

Objectif (a) : Les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> présentent une traduction augmentée du neuropeptide VIP. Comme mentionné dans l'introduction, l'absence de VIP augmente le SLP et le SP durant la nuit [269,270]. Nous avons donc avancé que la mutation augmenterait la quantité d'éveil, au profit du SLP et du SP. Pour 4E-BP2, considérant son expression plus importante dans le cerveau et que les souris 4E-BP2<sup>-/-</sup> ont des déficits d'interaction sociale et des comportements répétitifs, nous avons postulé que l'absence de 4E-BP2 pourrait mener à un phénotype du sommeil similaire aux patients atteints d'un trouble du spectre de l'autisme, soit une diminution de la consolidation du SLP et de l'AOL [253,254].

Objectif (b) : Les souris *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> surexpriment NLGN1 [208]. Nous savons que l'absence de *Nlgn1* altère la réponse EEG à la privation de sommeil, en augmentant la pression au sommeil pour une même période d'éveil [273]. Il est donc possible que la surexpression de NLGN1 ait l'effet opposé chez ces souris, c'est-à-dire qu'elle diminue l'accumulation de la pression homéostatique pendant un éveil prolongé. Considérant la fonction similaire entre les deux protéines, et que l'absence de 4E-BP1 augmente l'expression de NLGN1 dans la moelle épinière [179], nous avons émis l'hypothèse que l'absence de 4E-BP1 aurait les mêmes effets sur les paramètres mesurés.

## Chapitre 3 – Méthodologie et résultats : article de recherche

### 3.1 Contribution des co-auteurs à l'article

**Cassandra C Areal** a participé à la génération des hypothèses de recherche. Elle a participé aux chirurgies d'implantation EEG/EMG et réalisé les analyses de sommeil. Elle a extrait l'ARNm des cortex des souris afin de réaliser les expériences de qPCR. Elle a conçu l'ensemble des figures et rédigé le manuscrit. **Ruifeng Cao** a participé à la génération des hypothèses de recherche et a participé à la rédaction du manuscrit. **Nahum Sonenberg** a fourni les souris pour le projet de recherche et a participé à la rédaction du manuscrit. **Valérie Mongrain** a généré les hypothèses de recherche, a supervisé les expériences et défrayé les coûts pour les réactifs. Elle a également participé à l'analyse des résultats et a rédigé le manuscrit.



## 3.2 Article

### **Wakefulness/sleep architecture and electroencephalographic activity in mice lacking the translational repressor 4E-BP1 or 4E-BP2**

Cassandra C. AREAL<sup>1,2</sup>, Ruifeng CAO<sup>3,4</sup>, Nahum SONENBERG<sup>5</sup>

and Valérie MONGRAIN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Center and Center for Advanced Research in Sleep Medicine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal (CIUSSS-NIM), Montreal, QC, Canada; <sup>2</sup>Department of Neuroscience, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada; <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Minnesota Medical School, Duluth, MN, USA; <sup>4</sup>Department of Neuroscience, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN, USA; <sup>5</sup>Department of Biochemistry and Goodman Cancer Research Center, McGill University, Montreal, QC, Canada.

**Manuscript submitted for publication in:** *SLEEP*

**Number of words:** 230 in abstract, 119 in statement of significance, 8903 in total

**Content:** 1 table and 5 figures

*Article accepté à la revue Sleep en août 2019*

<https://doi.org/10.1093/sleep/zsz210>

## ABSTRACT

Sleep and sleep loss are impacting protein synthesis in the brain but the contribution of translational control to wakefulness and sleep regulation remains poorly understood. Here, we studied the role of two suppressors of protein synthesis, the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 and 2 (4E-BP1 and 4E-BP2), in sleep architecture and electroencephalographic (EEG) activity as well as in the EEG and molecular responses to acute sleep loss. The EEG of mice mutant for the genes encoding 4E-BP1 or 4E-BP2 (*Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* knockout [KO] mice) was recorded under undisturbed conditions and following a 6-h sleep deprivation (SD). The effect of SD on the expression of genes known to respond to SD was also measured in the prefrontal cortex of *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* KO mice. *Eif4ebp1* KO mice differed from wild-type mice in parameters of wakefulness and sleep quantity and quality, and more subtly in the gene expression response to SD. For instance, *Eif4ebp1* KO mice spent more time in slow wave sleep (SWS) and showed altered baseline 24-h time courses of SWS delta (1-4 Hz) activity and sigma (10-13 Hz) activity. *Eif4ebp2* KO mice differed from wild-type mice only for wakefulness and sleep quality, expressing changes in EEG spectral activity generally revealed during and after SD. These findings suggest different roles of effectors of translational control in the regulation of wakefulness and sleep and of synchronized cortical activity.

Keywords: protein synthesis, electroencephalography, spectral analysis, sleep deprivation, gene expression

## **Statement of Significance**

Protein synthesis is affected by wakefulness/sleep history, but a role for translational control in the regulation of wakefulness/sleep remains to be established. We found that the absence of one translational repressor, 4E-BP1, impacts wakefulness/sleep architecture and the normal dynamics of electroencephalographic activity during wakefulness and sleep; and that the absence of a second translational repressor, 4E-BP2, generally increases wakefulness/sleep electroencephalographic activity under sleep deprived conditions while leaving architecture unaffected. These results suggest different roles of two related regulators of protein synthesis in the control of wakefulness/sleep amount and quality. Given the importance of translational control in brain physiology and diseases such as autism, epilepsy and tuberous sclerosis complex, our findings point to pathways contributing to sleep disturbances in neuropathology.

## INTRODUCTION

Sleep is highly conserved across species and is essential for proper brain functioning. Alterations in the sleep-wake cycle are known to be a symptom of many neurological and psychiatric diseases, such as autism spectrum disorders [1, 2]. It is generally recognized that two main processes are controlling sleep: 1) a homeostatic process that determines sleep intensity in relation to the duration of prior wakefulness; and 2) a circadian process defining rhythmic periods of low and high sleep propensity across the 24-h [3, 4]. Specific features of sleep have been shown to be predominantly influenced in a homeostatic or a circadian manner, and have been used, respectively, as markers of the homeostatic or the circadian process. For instance, changes in sleep intensity quantified using delta (1-4 Hz) activity during slow wave sleep (SWS) reflects homeostatic sleep pressure, while the proportion of total sleep occupied by paradoxical sleep (PS) and theta (4-7 Hz) activity during PS mostly depend on circadian time [5, 6].

Sleep and sleep loss regulate gene transcription and protein synthesis, and shape plastic structural changes in the central nervous system [7, 8]. Sleep is indeed known to elevate messenger RNA levels of genes associated with protein synthesis in the cerebral cortex and hippocampus [9, 10], and SWS in particular was shown to correlate with increased protein synthesis [11, 12]. In an opposite manner, sleep deprivation (SD) negatively impacts genes important for translation [13]. Moreover, SD attenuates mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1-dependent protein synthesis [14], and inhibition of mTOR-dependent protein synthesis was shown to abolish sleep-dependent plasticity in the cerebral cortex [15]. However, even if there is considerable support for a modulatory role of sleep on mechanisms controlling translation, little is known concerning the potential role of the protein synthesis machinery in the regulation of wakefulness and sleep.

Protein synthesis is predominantly regulated at the stage of translation initiation, as a critical step in the initiation of translation is the recognition of the mRNA 5' cap by the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) [16]. Translation initiation is repressed by eIF4E-binding proteins (4E-BPs), which prevent binding of eIF4E to the eIF4G subunit of the translation initiation complex [16, 17]. The phosphorylation of 4E-BPs by mTOR results in the dissociation of 4E-BPs from eIF4E, and thus promotes 5' cap-dependent protein synthesis [16-18]. During nervous system development, mTOR fulfills numerous roles, notably in neuronal survival and differentiation, neurite growth and synaptogenesis [19]. In the adult brain, mTOR regulates many forms of neuronal plasticity [15, 16, 19], thus playing roles in learning and memory. Nevertheless, the role of mTOR and 4E-BPs in the regulation of wakefulness and sleep amount and quality remains unclear.

In mammals, three 4E-BPs have been identified (i.e., 4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3) [17], with murine 4E-BP1 and 4E-BP2 sharing 60% identity [20]. The gene coding for 4E-BP1 (i.e.,

*Eif4ebp1*) is expressed in most tissues with highest expression in skeletal muscle and pancreas, and low expression in the brain [20]. Strikingly, 4E-BP1 is found in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, where its phosphorylation varies with internal (circadian) time, and mice lacking 4E-BP1 (knockout: KO) show functional alterations in the central circadian clock [21]. The gene coding for 4E-BP2 (i.e., *Eif4ebp2*) is more abundantly expressed in the brain [20], where it was shown to regulate hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory [22]. In addition, *Eif4ebp2* KO mice display an increased ratio of excitatory to inhibitory synaptic transmission, which is associated with autistic-like behaviours such as deficits in social interaction and repetitive behaviours [23]. This indicates that *Eif4ebp2* KO mice could exhibit a sleep phenotype similar to patients with autism spectrum disorders, which is characterized by decreased sleep consolidation and SWS [1, 2].

We have investigated here the role of the translational repressors 4E-BP1 and 4E-BP2 in wakefulness and sleep regulation and their implication in the molecular response to sleep loss. We measured vigilance state duration and quality with electroencephalographic/ electromyographic (EEG/EMG) recordings and EEG spectral activity in *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* KO mice, with a particular focus on EEG markers of the homeostatic and circadian processes of sleep regulation. The response to a homeostatic challenge was thus measured using recordings performed during and after SD. Lastly, the homeostatic response to SD was further evaluated by measuring gene expression in the cerebral cortex of *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* KO mice by interrogating specific genes targeted for their recognized response to SD [9, 10, 13], using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The findings demonstrate that 4E-BP1 plays a role in the regulation of wakefulness and sleep quantity and quality, and that 4E-BP2 plays a role in the regulation of wakefulness and sleep EEG quality.

## METHODS

### Animals and protocol

*Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice were obtained as previously described [184,187][184,187][184,187][183,186][183,186][183,186][183,186][183,186][180,183][22, 24], and were both maintained on a C57BL/6J genetic background. Mice were housed under standard conditions (food/water available ad libitum, 22–25°C, 12 h light: 12 h dark cycle [LD12:12]). *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice were obtained by breeding heterozygous mice. However, to speed up breeding throughput, *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> and *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice were bred separately. Nine *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> (26.5 ± 2.3 g, 69.1 ± 0.8 days) and 11 *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> (27.7 ± 2.1 g, 70.6 ± 3.7 days) non-littermates were used for EEG/EMG recordings and gene expression measurements. Twelve *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> (29.0 ± 2.6 g, 77.4 ± 10.7 d) and 13 *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> (28.5 ± 3.3 g, 77.9 ± 11.4 d) littermates were used for EEG/EMG recordings and gene expression measurements. After electrode implantation surgery, recovery and adaptation to cabling (see below), the EEG and EMG were recorded continuously for 48 h starting at light onset (Zeitgeber time 0: ZT0) comprising a 24 h of undisturbed conditions, a 6-h SD starting at light onset (ZT0) and performed by gentle handling as described previously [25], and 18 h following SD. Mice were then uncabled and half of the animals were submitted to a second SD from ZT0 to ZT6 one week later immediately followed by sacrifice and brain sampling together with the other half of animals that was sacrificed after undisturbed conditions. The prefrontal cortex of the left and right hemispheres was rapidly dissected and frozen on dry ice. Four *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> and four *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> not used for EEG/EMG recording were added for gene expression measurements. The protocol was performed in strict accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care and approved by the Comité d'éthique de l'expérimentation animale of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal (CIUSSS-NIM).

### Electrode implantation surgery

EEG and EMG electrode implantation was performed as detailed previously [26–28]. Briefly, when mice reached 9–10 weeks, surgeries were performed under deep Ketamine/Xylazine anesthesia (120/10 mg/kg, i.p. injection) and followed by analgesia with Meloxicam (5 mg/kg, s.c. injection) and Bupivacaine (1.5 mg/kg, s.c. injection). Two gold-plated screws (diameter: 1.1 mm), screwed through the skull over the right cerebral hemisphere (anterior: 1.5 mm lateral to midline, 1.5 mm anterior to bregma; posterior: 1.5 mm lateral to midline, 1.0 mm anterior to lambda), served as EEG electrodes. An additional screw placed on the right hemisphere (2.6 mm lateral to midline, 0.7 mm posterior to bregma) served as a reference. Three anchor screws were implanted over the left hemisphere. Two gold wires were inserted between neck muscles to serve as EMG electrodes. The EEG and EMG electrodes were soldered to a connector and, together with the anchor screws,

cemented to the skull. Four days after surgery, mice were connected to a swivel contact and animals were allowed a week of habituation to cabling conditions before recording.

### **EEG recording and analyses**

The EEG and EMG signals were amplified (Lamont amplifier), sampled at 256 Hz and filtered using the commercial software Harmonie (Natus, Middleton, WI, USA) as done previously [26-28]. Vigilance states (wakefulness, slow wave sleep [SWS], and paradoxical sleep [PS]) were visually assigned to 4-s epoch as described before [29]. Artifacts were simultaneously identified and subsequently excluded from spectral analysis. Vigilance state duration was averaged for the first 12-h (light period, ZT0 to ZT12), the second 12-h (dark period, ZT12 to ZT24) and per hour for baseline (i.e., the first 24 h of recording under undisturbed conditions) and recovery (i.e., the second 24 h of recording comprising the 6-h SD and 18 h of recovery). The mean duration of individual bouts of vigilance states was also computed for the 12-h light and 12-h dark periods during baseline. For the recovery day, the total duration of SWS during SD was calculated as well as the latency to the first 10 epochs (40 sec) of SWS after the end of the 6-h SD.

Spectral analysis was performed using fast Fourier transform to calculate the EEG power density between 0.5 and 50 Hz (0.25-Hz bins) on the bipolar EEG signal of artifact-free epochs for wakefulness, SWS and PS. Power spectra were computed for the full 24-h of baseline and recovery and expressed as a percentage of the mean all-state EEG power of all frequencies during baseline for each mouse. To remove the large difference in amplitude between lower and higher frequencies for genotype comparison, spectral activity in each bin for each mouse was also normalized to the mean of wild-type mice. Normalized spectral activity was then averaged for 6 standard frequency bands for statistical comparisons (i.e., delta 1-4 Hz, theta 6-9 Hz, sigma 10-13 Hz, low beta 16-24 Hz, high beta 24-32 Hz and gamma 32-50 Hz). Spectral activity was also separately computed for delta (1-4 Hz) and sigma (10-13 Hz) frequency bands during SWS and for the theta (6-9 Hz) band during wakefulness for time course analyses. To take into account the distribution of wakefulness and sleep, the spectral activity in these three bands was averaged per interval containing an equal number of epochs of a given state as performed previously [27, 30]. More precisely, SWS delta and sigma activity were computed for 12 equal intervals during the light period, 6 equal intervals during the dark periods and 8 equal intervals during the 6-h light period following SD. Wakefulness theta activity was average for 6 equal intervals during the light period, 12 equal intervals during the dark periods, 8 equal intervals during the 6-h SD and 3 equal intervals during the 6-h light period following SD. The activity in the three frequency bands was expressed as a percentage of the mean of 24-h baseline for each mouse.

## Reverse transcription and qPCR

RNA extraction, reverse transcription and qPCR were performed similar to described elsewhere [26, 27]. Briefly, RNA was extracted from one prefrontal cortex per mouse using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada). The quality of RNA samples was assessed using agarose gel electrophoresis and the quantity with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For reverse transcription, 250 ng of RNA were used with random hexamers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) according to manufacturer's procedures. Gene expression was quantified for nine target genes (*Arc*, *Bdnf*, *Fos*, *Homer1a*, *Eif4ebp1*, *Eif4ebp2*, *Nrxn1*, *Nrxn2*, *Nrxn3*). *Arc*, *Bdnf*, *Fos* and *Homer1a* have been selected because of their well-established increase under conditions of SD [9, 10, 13, 26, 27, 30], *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* expression has been measured to confirm the absence of transcript in KO mice and to assess the effect of SD on their gene expression, and *Nrxns* have been included to explore synaptic components relevant to sleep loss [8]. Each mouse complementary DNA (cDNA) was diluted and used in 10  $\mu$ L reaction with Fast TaqMan Master Mix reagent (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) under standard cycling conditions: 50°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 1 sec and 60°C for 20 sec (ViiA7 real-time cycler, Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Primers were purchased from Invitrogen, Life Technologies or Operon (Huntsville, AL, USA), and probes from Invitrogen or Operon. Taqman Gene Expression Assay numbers and sequences of designed oligos are listed in Table 1. The relative mRNA expression was calculated using the modified  $\Delta\Delta C_t$  method of Expression Suite v1.0.3 (Life Technologies), with the first  $\Delta$  calculated using four endogenous control genes (i.e., *Actin*, TATA box binding protein (*Tbp*), Beta-glucuronidase (*GusB*) and Ribosomal protein S9 (*Rps9*)) and the second  $\Delta$  using means of non-sleep deprived wild-type mice.

## Statistical analyses

Statistica 6.1 (StatSoft Inc./Tibco Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was used to perform statistical analyses and Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) to prepare figures. Vigilance state variables calculated for the 12-h light and 12-h dark periods, and vigilance state variables specific to SD were compared between genotypes for both *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* by Student's *t* tests. Differences in vigilance state duration per hour, in normalized spectral activity per frequency bands and in time courses of delta, theta and sigma frequency bands between genotypes were assessed using two-way repeated-measure analyses of variance (rANOVAs; with factors Genotype and Hour, Genotype and Frequency band, and Genotype and Interval, respectively). Significant effects were adjusted for repeated measures using the Huynh–Feldt correction. For time



courses of EEG activity in frequency bands, rANOVAs were performed separately for the light and dark periods, given that two *Eif4ebp1*<sup>+/-</sup> mice and one *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mouse presented an absence of SWS during the baseline dark period and one *Eif4ebp2*<sup>+/-</sup> mouse an absence of SWS during the recovery dark period. In addition, one *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mouse was excluded from all recovery analyses because of continuous artifacts on the EEG. The effects of Genotype and SD on mRNA expression were evaluated by two-way factorial ANOVA (fANOVA). Significant interactions were decomposed using planned comparisons. The threshold for statistical significance was set to 0.05 and results are reported as mean ± standard error of the mean.

## RESULTS

### More time spent in sleep in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice

During baseline, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> spent less time in wakefulness (~67 min less) and more time in SWS (~61 min more) than *Eif4ebp1*<sup>+/-</sup> only during the 12-h dark period (Figure 1A). *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice were thus not significantly different from wild-type mice for wakefulness and SWS during the 12-h light period, and also expressed similar PS amount during the light and dark periods. In contrast, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice were similar to *Eif4ebp2*<sup>+/-</sup> mice for all vigilance states during both the 12-h light and dark periods. The 24-h distribution of wakefulness, SWS and PS were also analyzed to assess if modifications in the time spent in wakefulness and SWS during the dark phase in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice resulted from a global effect or from changes at specific hours (Figure 1B). More time was spent in SWS in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type mice mostly at the end of the dark period (ZT20 and ZT23; significant Genotype-by-Hour interaction). This was accompanied by less time spent in wakefulness at the same hours (significant interaction). Moreover, the analysis of the hourly distribution revealed more time spent in PS in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> compared to *Eif4ebp1*<sup>+/-</sup> mice for several hours during the nycthemeron (i.e., ZT1, ZT2, ZT5 and ZT23; significant Genotype-by-Hour interaction; Figure 1B). The 24-h distribution of wakefulness, SWS and PS was similar between *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>+/-</sup> mice.

The mean duration of individual bouts of the three vigilance states during baseline was calculated in *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* mice as an index of sleep consolidation/fragmentation. Longer and fewer bouts are usually a marker of consolidated wakefulness and sleep, whereas fragmented wake/sleep is reflected by more frequent and brief bouts. During the 12-h dark period, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice had longer PS bouts (~23 sec longer) than wild-type mice (Figure 1C). This may have contributed to the increased time spent in PS observed for some hours during the dark phase

(Figure 1B). No change was observed for the 12-h light period. Knockout of *Eif4ebp2* did not modified the duration of individual bouts of vigilance states. Also, no change was observed for the number of bouts in any of the vigilance states (data not shown), supporting an overall preservation of the consolidation of wakefulness and sleep in the absence of 4E-BP1 or of 4E-BP2. In summary, these results indicate that *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice have altered wakefulness and sleep amount, which is mostly due to changes occurring during the late active/dark period.

### **Altered EEG activity in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice**

Spectral analysis of the EEG was performed to verify whether *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* deletions impact the quality of wakefulness and sleep states (Figure 2). The deletion of *Eif4ebp1* or *Eif4ebp2* engendered subtle effects on 24-h EEG power spectra (Figure 2B). More precisely, during wakefulness, the absence of 4E-BP1 showed a tendency for lower spectral power than wild-type mice in all frequency bands (Genotype effect  $p < 0.08$ ). During SWS, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice did not significantly differ from wild-type mice in the power spectrum. During PS, a tendency for a Genotype-by-Frequency band interaction was found ( $p = 0.08$  [ $p < 0.04$  without Huynh–Feldt correction]). *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice appeared to have less spectral power in the delta frequency band (1 to 4 Hz) and more power in the theta band (6 to 9 Hz) in comparison to *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice. Conversely, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice showed tendencies for more spectral power than wild-type littermates for all frequency bands during wakefulness and PS (Genotype effects  $p = 0.09$  and  $p = 0.06$ , respectively), which seems particularly apparent for higher frequencies (low beta 16-24 Hz, high beta 24-32 Hz and gamma 32-50 Hz) during wakefulness and delta and beta frequency bands during PS (Figure 2B). The *Eif4ebp2* deletion did not significantly change the power spectrum of SWS. In sum, the absence of 4E-BP1 tends to generally decrease synchronized cortical activity during wakefulness and PS during baseline, whereas the absence of 4E-BP2 tends to increase it for these two states.

Next, to better characterize markers of sleep regulatory processes, we examined the 24-h time course of spectral activity in specific frequency bands. The time courses of wakefulness theta (6-9 Hz), SWS delta (1-4 Hz) and SWS sigma (10-13 Hz) activity were significantly different in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice compared to *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice (Figure 2C). Indeed, a Genotype-by-Interval interaction revealed a modified time course of theta activity during the light period for wakefulness in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice that likely results from alterations in relative changes between intervals because there was no specific interval for which genotypes significantly differ. Then, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice expressed a decrease of delta activity for specific intervals during the light period, especially located at the beginning of the light period and thus potentially suggesting a lower level of homeostatic sleep pressure at the beginning of the rest period. Finally, a blunted light-dark rhythm of sigma activity appeared in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice, mostly resulting from lower activity during some intervals of the dark

period. In contrast, the baseline time courses of wakefulness theta, SWS delta and SWS sigma activity were completely conserved in *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice in comparison to *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> mice (Figure 2C).

### **Altered EEG response to SD in *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice**

To further explore the role of 4E-BP1 and 4E-BP2 in sleep homeostasis, we next measured the EEG response to SD in KO mice. During SD, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice were deprived from the same amount of SWS (on average > 94%) in comparison to corresponding wild-type mice (Figure 3A, upper panel). The latency to SWS after SD was also similar between *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice and wild-type mice (Figure 3A, bottom panel). Similar to observations made for baseline, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice spent less time in wakefulness (~54 min) and more time in SWS (~43 min) than *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice during the 12-h dark period following SD (Figure 3B). However, the time courses of the three vigilance states were no longer significantly different between *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice for the 24-h recovery (Figure 3C), which indicates a global effect of the mutation. Also similar to baseline observations, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice did not significantly differ from *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> mice in time spent in vigilance states and in 24-h distribution of vigilance states (Figure 3B and 3C).

Next, EEG power spectra and time courses of activity in frequency bands during and after SD revealed fewer genotype differences in comparison with baseline data for *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice but more differences in comparison to baseline for *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 4A, 4B). First, similar to baseline, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice showed a tendency for lower power in all frequency bands during wakefulness in comparison to *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice (Genotype effect  $p = 0.1$ ), similar SWS power and a tendency for lower delta power and higher theta power during PS (interaction  $p < 0.1$ ; Figure 4B). Also similar to baseline, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice presented more spectral power than wild-type littermates for all frequency bands during both wakefulness and PS (Figure 4B). However, these *Eif4ebp2* genotype differences reached statistical significance during recovery, which was not the case during baseline.

During recovery, the time courses of wake theta activity, of SWS delta activity, and of SWS sigma activity did not differ between *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice (Figure 4C). The time course of wake theta was different between *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> mice for the dark phase during recovery, but this was not associated with significant genotype differences at precise intervals. The analysis of the SWS delta activity time course in response to SD revealed an altered time course in *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> compared to *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> mice (Figure 4C). More precisely, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice expressed an increased relative delta activity at the beginning of the recovery dark period. This result could be due to the observation that these mice had more wakefulness in the first 2h of the dark period following SD than *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> mice (from ZT12 to ZT14;  $t = 2.3$ ,  $p = 0.03$ ; see Figure 3C), which

should result in an increased homeostatic sleep pressure. Similar to *Eif4ebp1*, the SWS sigma activity time course during recovery was not significantly modified by the *Eif4ebp2* deletion. Globally, the EEG activity response to SD is mostly unaffected by the *Eif4ebp1* deletion whereas it appears to be amplified by the *Eif4ebp2* deletion.

### **Altered gene expression response to SD in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice**

We investigated the effects of the absence of 4E-BP1 or 4E-BP2 on the expression of selected genes following SD in order to assess their potential contribution to the molecular response to SD. To do so, we measured messenger RNA (mRNA) steady-state levels at ZT6 of nine genes in the prefrontal cortex of mice immediately following SD and of mice left undisturbed (controls). Consistent with previous literature [9, 10, 13, 26, 27, 30], the expression of the immediate early (plasticity-related) genes *Arc*, *Fos* and *Homer1a* was increased by SD in comparison to undisturbed conditions (Figure 5). The KO of *Eif4ebp1* or of *Eif4ebp2* did not affect this increase. The previously reported SD-induced increase in *Bdnf* gene expression [9, 26, 27, 31] was also observed in *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> mice but did not reach statistical significance in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice. This last observation may be due the apparent complete lack of SD-induced increase in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice.

The expression of *Eif4ebp1* mRNA was not detectable in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice, as the expression of *Eif4ebp2* mRNA in *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice, confirming the absence of the transcripts (Figure 5). SD decreased the mRNA level of *Eif4ebp1* in *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice and increased the expression of *Eif4ebp2* in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice. The expression of *Nrxn3*, which encodes a synaptic adhesion protein located at the presynapse, was significantly increased by SD in *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice but not in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice, likely resulting from a high mRNA level under baseline conditions in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice (Figure 5). The expression of genes coding for the related presynaptic proteins *Nrxn1* and *Nrxn2* was not significantly changed by SD or by the *Eif4ebp1* and *Eif4ebp2* deletions. Overall, SD-induced changes in prefrontal gene expression are slightly attenuated in the absence of 4E-BP1 but preserved in the absence of 4E-BP2.

## DISCUSSION

In the present study, we used electrophysiology and molecular biology to investigate the effects of the absence of either 4E-BP1 or 4E-BP2 on wakefulness and sleep quantity and quality as well as on well-characterized homeostatic responses to sleep loss. We report multiple modifications in wakefulness and sleep quantity and quality in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice comprising more time spent in SWS during the active period and modified time course of spectral activity in various frequency bands during wakefulness and SWS under undisturbed conditions. This was associated with a modest attenuation of the gene expression response to SD. On the other hand, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice showed alterations in wakefulness and sleep phenotypes restricted to spectral activity during wakefulness and sleep mainly revealed under high sleep pressure conditions. Together, these results highlight the implication of specific translational control effectors in sleep regulation and suggest different roles for 4E-BP1 and 4E-BP2 in the regulation of wakefulness and sleep.

As indicated in the introduction, there are three 4E-BPs (1, 2 and 3) and it is not feasible to study various deletions and their combinations in a single study. Given that 4E-BP1 and 4E-BP2 are more important in the brain, we selectively studied them independently to compare their roles in sleep regulation. Contrary to our expectations vis-a-vis the association between 4E-BP2 and autistic-like behaviours [23], the absence of 4E-BP2 did not engender a sleep phenotype similar to patients with autism (e.g., less time spent in SWS, decreased sleep consolidation) [1, 2]. Indeed, the sleep architecture was strikingly similar in *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice, both under baseline and sleep deprived conditions. This could be explained by a marginal role of 4E-BP2 in brainstem and hypothalamic areas controlling wakefulness and sleep duration and alternation, such as the parabrachial nucleus and hypothalamic preoptic areas [32]. However, although 4E-BP1 is much less abundant in the brain than 4E-BP2 [20, 22], its absence had greater impact on wakefulness and sleep duration. More precisely, the absence of 4E-BP1 was detrimental to wakefulness and resulted in increased sleep states, which was particularly manifested in the active/dark period. As indicated in the introduction, 4E-BP1 is expressed in the SCN and plays a role in the functioning of the circadian timing system [21]. The SCN was shown to have outputs directed to brainstem areas of the ascending arousal system, such as the locus coeruleus [33]. It is thus possible that altered circadian function in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice [21] is accompanied by impaired circadian outputs to the arousal system resulting in decreased wakefulness. Our observation that the decrease in time spent in wakefulness is mainly observed during a specific time window within the 24-h day (i.e., the second half of the active/period) also supports the implication of the circadian timing system in mediating the effect of 4E-BP1 absence on wake/sleep architecture.

Along the same line, a strong circadian regulation of the activation of hypothalamic orexin cells was reported in mice [34] and the SCN has been shown to regulate the 24-h rhythm in orexin level in the rat cerebrospinal fluid [35]. More precisely, the peak of orexin expression occurring during the late active/dark period was abolished by a lesion to the SCN [35]. Orexin neurons favor the transition to wakefulness [36]. Accordingly, an altered SCN function in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice could change orexin transmission during the active/dark period and lead to less time spent in wakefulness at this 'circadian' time. Nevertheless, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice have higher level of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the SCN [21], which could result in less sleep during the active/dark period given that *Vip* KO mice display more sleep specifically during this period [37]. It is noteworthy that, on the contrary, application of VIP to other brain regions was shown to enhance sleep [38, 39]. Targeted studies are required to differentiate the SCN-dependent and independent roles of 4E-BP1 in the regulation of wakefulness and sleep.

Our results indicate that the quality of vigilance states assessed using spectral analysis of the EEG was modified by the absence of 4E-BP1 or of 4E-BP2. Concerning wakefulness specifically, their absence appeared to have opposite effects on spectral power. This is surprising given the similar role of these two translation repressors in cap-dependent translation [16] and in the neuronal organization of the cerebral cortex [40]. Moreover, absences of 4E-BP1 and 4E-BP2 were both shown to increase the expression of the synaptic adhesion molecule Neuroligin-1 in the spinal cord and hippocampus, respectively [23, 41]. An increase in Neuroligin-1 level in the central nervous system would be expected to increase EEG spectral power in the theta/alpha range during wakefulness because we have shown that *Neuroligin-1* KO mice have lower power in these frequencies [26]. The tendency for *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice to have a reduced power in theta frequencies may thus suggest a mechanism independent of Neuroligin-1, which would also be supported by observations in vigilance states other than wakefulness. Findings in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice should nevertheless be interpreted with caution given that non-littermates were studied. In *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice, the tendency for increased spectral power in all frequency bands during wake could be linked to the reported synaptic alterations in these mice. Indeed, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice have a facilitated hippocampal LTP and present an increased ratio of synaptic excitation to inhibition [22, 23], which could both contribute to enhanced cortical synchronization captured in faster frequencies at the level of the wakefulness (and PS) EEG. Besides, cell type-specific roles of 4E-BP1 and 4E-BP2, as reported for immune cells [42], are likely contributing to their differential effects on the wakefulness and sleep EEG.

In parallel, modifications in outputs of the SCN to orexin neurons could also contribute to changes in EEG activity during wakefulness and sleep in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice because *orexin* KO mice

were shown to express multiple alterations in the spectral composition of the wakefulness and SWS EEG [43]. It is also interesting to note that mTOR seems part of an intracellular signaling pathway mediating orexin neurotransmission [44]. This could support, as also raised above, a role for 4E-BPs in modulating EEG activity via the orexin system independent of the circadian timing system. Nonetheless, alteration in the amplitude of the 24-h time course of SWS sigma activity in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice could also be linked to a circadian dysfunction because the daily dynamics of SWS sigma activity has been associated with the circadian regulation of sleep [5, 6, 45]. Given that SWS sigma activity is indicative of sleep spindles [5, 45], our specific observation of decreased sigma during the baseline dark period in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice may point to a decreased circadian drive for spindles at this time of the day.

The time course of SWS delta activity, a marker of sleep homeostasis [5, 45], was also modified in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice in comparison to *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> mice. In particular, *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice showed lower delta activity at the beginning of the rest/light period, which could indicate lower homeostatic sleep pressure to start their resting phase. This lower pressure could easily be explained by the enhanced time spent in SWS at the end of the active/dark period in these mutant animals. In fact, when KO mice were deprived from the same amount of sleep as wild-type mice (i.e., using SD), a preserved homeostatic response to SD was observed in the absence of 4E-BP1. This is reminiscent of alterations in the baseline dynamics of SWS delta activity together with an intact SWS delta activity rebound after SD in *orexin* KO mice [43]. Unlike *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice, the absence of 4E-BP2 resulted in more modifications of EEG activity during wakefulness and sleep under homeostatically challenged/sleep deprived conditions in comparison to wild-type mice. In particular, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice showed significantly more activity during both wakefulness and sleep, which was not present during baseline and, concerning SWS delta activity in particular, seemed to predominate 6 h after the end of SD. These contrasting effects of SD in the absence of 4E-BP1 or 4E-BP2 further support roles of the two repressors in different sleep regulatory circuits and/or cell types. In parallel, different subcellular localization of these translational repressors may differently shape neuronal excitability in the neocortex and consequently EEG activity under increased homeostatic sleep pressure. 4E-BP2 indeed appears to be enriched at postsynaptic sites and lower in dendritic shafts in comparison to 4E-BP1 in hippocampal neurons in culture [46].

Similar to our observation of contrasting EEG responses to SD in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> versus *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice, their gene expression was differently changed by SD. SD was previously shown to decrease the level of phosphorylated 4E-BP2 in the hippocampus but to leave total 4E-BP2 level intact [14]. Similarly, SD was shown to decrease the level of phosphorylated 4E-BP1 in the visual cortex following monocular deprivation in comparison to sleep [15]. These two studies highlighted

roles for 4E-BPs in sleep-dependent plasticity in two different brain areas. However, in the present study, the mRNA expression of *Eif4ebp1* and of *Eif4ebp2* in the prefrontal cortex is changing in opposite directions with SD, with *Eif4ebp1* being decreased and *Eif4ebp2* increased. In line with overall trends in power spectra modifications in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice, this observation supports different roles of these two translation repressors in sleep regulation (or similar roles in different cell types). Of interest is also that the gene expression response to SD appears to be altered by the absence of 4E-BP1 specifically. In fact, the increased expression of precise genes related to synaptic function and plasticity was no longer observed in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> mice, which appears to result from elevated expression under baseline conditions. This finding supports the previously proposed role for 4E-BP1 in wake/sleep-related modifications of neuronal plasticity [15].

Several observations support the conclusion that protein synthesis/regulation is impacted by wakefulness and sleep history [47, 48]. This is illustrating the role of the sleep/wake cycle in the regulation of required cellular mechanisms such as translation and represents an explanation for the deleterious effects of sleep loss on functions depending on protein synthesis (e.g., memory consolidation, some forms of neuronal plasticity) [14, 15, 47]. Our current findings are supporting a bidirectional relationship between wakefulness/sleep and the translation machinery by highlighting that the absence of translational repressors impacts wakefulness and sleep quality as quantified using EEG spectral analysis. Assessing the role of mTOR itself in the regulation of the wakefulness and sleep EEG, for instance by recording the EEG of viable mTOR heterozygous mice, will help to understand the more global role of the protein synthesis machinery in wakefulness and sleep regulation as well as the pathophysiology of sleep disturbances in brain diseases involving mTOR-opathy [49, 50]. Our study warrants future research to evaluate the contribution of the role of the mTOR pathway in nervous system development [19] in the sleep phenotype of *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> mice by, for instance, studying genetic inactivation or overexpression of translational repressors performed at different developmental ages. Importantly, such strategy will also allow investigating brain region- and cell type-specific roles of 4E-BPs to better understand the specific roles of 4E-BP1 and 4E-BP2 in the regulation of wakefulness and sleep.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are thankful to A. Sylvestre, E. Bélanger-Nelson, C. Provost, C. Bouchard, D. Petit and G. Poirier for technical help, and to colleagues who have provided help with sleep deprivation (J. Dufort-Gervais, L. Hannou, B. S. Seok, E. K. O'Callaghan, N. Lemmetti).

## **FUNDING**

The research has been supported by M.Sc. fellowships of the Department of Neuroscience and of the Faculty of medicine of the Université de Montréal to CCA, salary awards from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Fonds de Recherche du Québec-Santé to VM, the Canada Research Chair in Sleep Molecular Physiology (VM), and a CIHR grant to NS.

## REFERENCES

1. Limoges E, *et al.* Atypical sleep architecture and the autism phenotype. *Brain*. 2005;**128** (Pt 5):1049-1061.
2. Ballester P, *et al.* Sleep problems in adults with autism spectrum disorder and intellectual disability. *Autism Res*. 2018. doi: 10.1002/aur.2000.
3. Daan S, *et al.* Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol*. 1984;**246** (2 Pt 2):R161-R183.
4. Borbély AA, *et al.* The two-process model of sleep regulation: a reappraisal. *J Sleep Res*. 2016;**25**(2):131-143. doi: 10.1111/jsr.12371.
5. Dijk DJ, Czeisler CA. Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *J Neurosci*. 1995;**15** (5 Pt 1):3526-3538.
6. Yassenkov R, Deboer T. Interrelations and circadian changes of electroencephalogram frequencies under baseline conditions and constant sleep pressure in the rat. *Neuroscience*. 2011;**180**:212-221. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.01.063.
7. Rachalski A, *et al.* Contribution of transcriptional and translational mechanisms to the recovery aspect of sleep regulation. *Ann Med*. 2014;**46**(2):62-72.
8. Areal CC, *et al.* Sleep loss and structural plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;**44**:1-7. doi: 10.1016/j.conb.2016.12.010.
9. Cirelli C, *et al.* Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron*. 2004;**41**(1):35-43.
10. Mackiewicz M, *et al.* (2007) Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiol Genomics*. 2007;**31**(3):441-457.
11. Ramm P, Smith CT. Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat. *Physiol Behav*. 1990;**48**(5):749-753.
12. Nakanishi H, *et al.* Positive correlations between cerebral protein synthesis rates and deep sleep in *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci*. 1997;**9**(2):271-279.
13. Vecsey CG, *et al.* Genomic analysis of sleep deprivation reveals translational regulation in the hippocampus. *Physiol Genomics*. 2012;**44**(20):981-991.
14. Tudor JC, *et al.* Sleep deprivation impairs memory by attenuating mTORC1-dependent protein synthesis. *Sci Signal*. 2016;**9**(425):ra41.
15. Seibt J, *et al.* Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo. *Curr Biol*. 2012;**22**(8):676-682.
16. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. 2009;**136**(4):731-745.
17. Burnett PE, *et al.* RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;**95**(4):1432-1437.
18. Gingras AC, *et al.* eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*. 1999;**68**:913-963.
19. Swiech L, *et al.* Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta*. 2008;**1784**(1):116-132.

20. Tsukiyama-Kohara K, *et al.* Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2. *Genomics*. 1996;**38**(3):353-363.
21. Cao R, *et al.* Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling. *Neuron*. 2013;**79**(4):712-724.
22. Banko JL, *et al.* The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *J Neurosci*. 2005;**25**(42):9581-9590.
23. Gkogkas CG, *et al.* Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature*. 2013;**493**(7432):371-377.
24. Tsukiyama-Kohara K, *et al.* Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat Med*. 2001;**7**:1128-1132.
25. Franken P, *et al.* Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am J Physiol*. 1991;**261**:R198-R208.
26. El Helou J, *et al.* Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;**110**(24):9974-9979.
27. Freyburger M, *et al.* EphA4 is involved in sleep regulation but not in the electrophysiological response to sleep deprivation. *Sleep*. 2016;**39**(3):613-624.
28. Seok BS, *et al.* The effect of Neuroligin-2 absence on sleep architecture and electroencephalographic activity in mice. *Mol Brain*. 2018;**11**(1):52.
29. Franken P, *et al.* Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice. *Sleep*. 1999;**22**:155-169.
30. Curie T, *et al.* Homeostatic and circadian contribution to EEG and molecular state variables of sleep regulation. *Sleep*. 2013;**36**(3):311-323.
31. Mongrain V, *et al.* Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis. *Sleep*. 2010;**33**(9):1147-1157.
32. Saper CB, Fuller PM. Wake-sleep circuitry: an overview. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;**44**:186-192. doi: 10.1016/j.conb.2017.03.021.
33. Aston-Jones G, *et al.* A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci*. 2001;**4**(7):732-738.
34. Marston OJ, *et al.* Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons. *Mol Brain*. 2008;**1**:19. doi: 10.1186/1756-6606-1-19.
35. Zhang S, *et al.* Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep*. 2004;**27**(4):619-627.
36. Adamantidis AR, *et al.* Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*. 2007;**450**(7168):420-424.
37. Bedont JL, *et al.* An LHX1-Regulated Transcriptional Network Controls Sleep/Wake Coupling and Thermal Resistance of the Central Circadian Clockworks. *Curr Biol*. 2017;**27**(1):128-136. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.008.
38. Bourgin P, *et al.* Rapid eye movement sleep induction by vasoactive intestinal peptide infused into the oral pontine tegmentum of the rat may involve muscarinic receptors. *Neuroscience*. 1999;**89**(1):291-302.

39. Simón-Arceo K, *et al.* Long-lasting enhancement of rapid eye movement sleep and pontogeniculooccipital waves by vasoactive intestinal peptide microinjection into the amygdala temporal lobe. *Sleep*. 2003;**26**(3):259-264.
40. Lin TV, *et al.* Normalizing translation through 4E-BP prevents mTOR-driven cortical mislamination and ameliorates aberrant neuron integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;**113**(40):11330-11335.
41. Khoutorsky A, *et al.* Translational control of nociception via 4E-binding protein 1. *Elife*. 2015;**4**. doi: 10.7554/eLife.12002.
42. So L, *et al.* The 4E-BP-eIF4E axis promotes rapamycin-sensitive growth and proliferation in lymphocytes. *Sci Signal*. 2016;**9**(430):ra57. doi: 10.1126/scisignal.aad8463.
43. Vassalli A, Franken P. Hypocretin (orexin) is critical in sustaining theta/gamma-rich waking behaviors that drive sleep need. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;**114**(27):E5464-E5473. doi: 10.1073/pnas.1700983114.
44. Wang Z, *et al.* Orexin/hypocretin activates mTOR complex 1 (mTORC1) via an Erk/Akt-independent and calcium-stimulated lysosome v-ATPase pathway. *J Biol Chem*. 2014;**289**(46):31950-31959.
45. Dijk DJ, *et al.* Variation of electroencephalographic activity during non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep with phase of circadian melatonin rhythm in humans. *J Physiol*. 1997;**505**:851-858.
46. Tang SJ, *et al.* A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**(1):467-472.
47. Seibt J, Frank MG. Translation regulation in sleep: making experience last. *Commun Integr Biol*. 2012;**5**(5):491-495.
48. Diering GH *et al.* Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. *Science*. 2017;**355**(6324):511-515.
49. Bruni O, *et al.* Sleep disorders in tuberous sclerosis: a polysomnographic study. *Brain Dev*. 1995;**17**(1):52-56.
50. van Eeghen AM *et al.* Characterizing sleep disorders of adults with tuberous sclerosis complex: a questionnaire-based study and review. *Epilepsy Behav*. 2011;**20**(1):68-74. doi: 10.1016/j.yebeh.2010.10.023.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 3.1. Baseline sleep architecture in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> (BP1<sup>-/-</sup>) and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> (BP2<sup>-/-</sup>) mice. (A)** Proportion of time spent in wake, SWS and PS for the 12h-light and 12h-dark periods. Wake and SWS percent were significantly different between BP1<sup>+/+</sup> and BP1<sup>-/-</sup> mice during the 12-h dark period ( $t = \pm 2.5$ ,  $*p = 0.02$ ). No significant difference was found for the light period ( $-0.7 < t < 1.2$ ,  $p > 0.2$ ) or for PS ( $-2.1 < t < -1.9$ ,  $p > 0.05$ ) or for BP2 ( $-0.5 < t < 0.3$ ,  $p > 0.6$ ). Grey backgrounds indicate the 12-h dark period (also in B and C). **(B)** Time spent in wake, SWS and PS computed per hour (left y-axes for BP1 and right y-axes for BP2). Genotype-by-Hour interactions were found for wake, SWS and PS in the BP1 group (rANOVA:  $F_{23,414} > 1.7$ ,  $p \leq 0.02$ ;  $t$  test:  $*p < 0.05$  between *bp1*<sup>-/-</sup> and *bp1*<sup>+/+</sup>). No effect of Genotype (rANOVA:  $F_{1,23} < 0.7$ ,  $p > 0.4$ ) or interaction (rANOVA:  $F_{23,529} < 1.0$ ,  $p > 0.5$ ) was found for the BP2 group. **(C)** Mean duration of individual bouts of wake, SWS and PS for the 12h-light and 12h-dark period. BP1<sup>-/-</sup> mice have longer PS bouts during the dark period ( $t = -2.7$ ,  $*p = 0.02$ ). No significant difference was observed for BP1 during the light period for PS and for wake and SWS ( $-2.0 < t < 2.0$ ,  $p > 0.07$ ), and for all states in BP2 mice ( $-1.1 < t < 1.7$ ,  $p > 0.1$ ).

**Figure 3.2. Baseline EEG activity in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> (BP1<sup>-/-</sup>) and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> (BP2<sup>-/-</sup>) mice. (A)** 24-h power spectra of wake, SWS and PS in BP1<sup>+/+</sup>, BP1<sup>-/-</sup>, BP2<sup>+/+</sup> and BP2<sup>-/-</sup> mice. Errors bars have been omitted for clarity. **(B)** Spectral power represented for wake, SWS and PS in percent mean BP1<sup>+/+</sup> or BP2<sup>+/+</sup> mice (left y-axes for BP1 and right y-axes for BP2; also in C). BP1<sup>+/+</sup> and BP1<sup>-/-</sup> did not significantly differ in spectral power during wakefulness (Genotype effect:  $F_{1,18} = 3.5$ ,  $p < 0.08$ ; Genotype-by-Frequency band interaction:  $F_{5,90} = 1.4$ ,  $p = 0.2$ ), SWS (Genotype effect:  $F_{1,18} = 0.1$ ,  $p = 0.8$ ; interaction:  $F_{5,90} = 0.1$ ,  $p = 0.9$ ) and PS (Genotype effect:  $F_{1,18} = 0.3$ ,  $p = 0.6$ ; interaction:  $F_{5,90} = 2.5$ ,  $p = 0.08$ ). Similarly, BP2<sup>+/+</sup> and BP2<sup>-/-</sup> did not significantly differ in spectral power during wakefulness (Genotype effect:  $F_{1,23} = 3.1$ ,  $p = 0.09$ ; interaction:  $F_{5,115} = 0.04$ ,  $p = 0.99$ ), SWS (Genotype effect:  $F_{1,23} = 0.05$ ,  $p = 0.8$ ; interaction:  $F_{5,115} = 1.5$ ,  $p = 0.2$ ) and PS (Genotype effect:  $F_{1,23} = 3.9$ ,  $p < 0.06$ ; interaction:  $F_{5,115} = 0.9$ ,  $p = 0.5$ ). Data for higher frequencies (30-50 Hz) are only represented for BP2 mice in wake because of no apparent difference for the other vigilance states and genotypes. **(C)** 24-h time course of wake theta (6-9 Hz), SWS delta (1-4 Hz) and SWS sigma (10-13 Hz) activity in BP1<sup>+/+</sup>, BP1<sup>-/-</sup>, BP2<sup>+/+</sup> and BP2<sup>-/-</sup> mice. For theta, a Genotype-by-Interval interaction was found for *Eif4ebp1* mice during the 12-h light period (rANOVA:  $F_{5,90} = 3.1$ ,  $p = 0.02$ ), but not during the dark period (rANOVA:  $F_{11,198} = 0.8$ ,  $p = 0.6$ ). For BP1, Genotype-by-Interval interactions were also found for delta activity during the light period (rANOVA:  $F_{11,187} = 3.4$ ,  $p = 0.01$ ;  $t$  tests:  $*p < 0.05$  between BP1<sup>-/-</sup> and BP1<sup>+/+</sup>) and for sigma activity during the dark period (rANOVA:  $F_{5,75} = 4.3$ ,  $p = 0.002$ ;  $t$  tests:  $*p < 0.05$  between BP1<sup>-/-</sup> and BP1<sup>+/+</sup>), but not for delta during the dark

and sigma during the light (rANOVA:  $F_{5/11,80/198} < 1.2$ ,  $p > 0.3$ ). No interaction reached statistical significance for BP2 mice (rANOVA:  $F_{5/11,110/115/253} \leq 1.5$ ,  $p \geq 0.1$ ). Grey backgrounds indicate the 12-h dark period.

**Figure 3.3. Sleep architecture parameters during and after SD in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> (BP1<sup>-/-</sup>) and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> (BP2<sup>-/-</sup>) mice.** (A) SWS during SD and latency to SWS after SD did not significantly differ between genotypes in both BP1 and BP2 groups (SWS during SD:  $t \leq 0.6$ ,  $p \geq 0.5$ ; SWS latency:  $t \leq 0.5$ ,  $p \geq 0.6$ ). (B) Proportion of time spent in wake, SWS and PS for the 12h-light and 12h-dark periods. Wake and SWS percent were significantly different between BP1<sup>+/+</sup> and BP1<sup>-/-</sup> mice during the 12-h dark period ( $t = \pm 2.2$ ,  $*p = 0.04$ ). No difference was found for the light period ( $t = \pm 1.1$ ,  $p = 0.3$ ) or for PS ( $-2.1 < t < 0.5$ ,  $p > 0.06$ ) or for BP2 ( $-1.4 < t < 1.2$ ,  $p > 0.19$ ). Grey backgrounds indicate the 12-h dark period (also in C). (C) Time spent in wake, SWS and PS computed per hour (left y-axes for BP1 and right y-axes for BP2). No genotype effect or Genotype-by-Hour interaction was found for wake, SWS and PS in the BP1 group (Genotype:  $F_{1,18} < 4.1$ ,  $p > 0.05$ ; interaction:  $F_{17/23,306/414} < 1.6$ ,  $p > 0.08$ ) or in the BP2 group (Genotype:  $F_{1,22} < 1.1$ ,  $p > 0.3$ ; interaction:  $F_{23/17,506/374} < 1.4$ ,  $p > 0.1$ ). Hatched areas represent the 6-h SD.

**Figure 3.4. EEG activity during and after SD in *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> (BP1<sup>-/-</sup>) and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> (BP2<sup>-/-</sup>) mice.** (A) 24-h power spectra of wake, SWS and PS in BP1<sup>+/+</sup>, BP1<sup>-/-</sup>, BP2<sup>+/+</sup> and BP2<sup>-/-</sup> mice. Errors bars have been omitted for clarity. (B) Spectral power represented for wake, SWS and PS in percent mean BP1<sup>+/+</sup> or BP2<sup>+/+</sup> mice (left y-axes for BP1 and right y-axes for BP2; also in C). BP1<sup>+/+</sup> and BP1<sup>-/-</sup> did not significantly differ in spectral power during wakefulness (Genotype effect:  $F_{1,18} = 2.4$ ,  $p = 0.1$ ; Genotype-by-Frequency band interaction:  $F_{5,90} = 0.3$ ,  $p = 0.9$ ), SWS (Genotype effect:  $F_{1,18} = 0.01$ ,  $p = 0.9$ ; interaction:  $F_{5,90} = 0.6$ ,  $p = 0.7$ ) and PS (Genotype effect:  $F_{1,18} = 0.7$ ,  $p = 0.4$ ; interaction:  $F_{5,90} = 2.0$ ,  $p = 0.09$ ). BP2<sup>+/+</sup> and BP2<sup>-/-</sup> significantly differed in spectral power during wakefulness (Genotype effect:  $F_{1,22} = 7.6$ ,  $p = 0.01$ ; interaction:  $F_{5,110} = 2.5$ ,  $p = 0.06$ ) and PS (Genotype effect:  $F_{1,22} = 6.5$ ,  $p = 0.02$ ; interaction:  $F_{5,110} = 0.4$ ,  $p = 0.8$ ), but not during SWS (Genotype effect:  $F_{1,22} = 1.5$ ,  $p = 0.2$ ; interaction:  $F_{5,110} = 1.7$ ,  $p = 0.15$ ). Data for higher frequencies (30-50 Hz) are only represented for BP2 mice in wake because of no apparent difference for the other vigilance states and BP1 genotypes. (C) 24-h time course of wake theta (6-9 Hz), SWS delta (1-4 Hz) and SWS sigma (10-13 Hz) activity in BP1<sup>+/+</sup>, BP1<sup>-/-</sup>, BP2<sup>+/+</sup> and BP2<sup>-/-</sup> mice. For theta activity, no Genotype effect (rANOVA:  $F_{1,18} \leq 2.7$ ,  $p \geq 0.1$ ) or Genotype-by-Interval interaction (rANOVA:  $F_{10/11,180/198} \leq 1.5$ ,  $p \geq 0.1$ ) was found for BP1 mice, but a Genotype-by-Interval interaction was found for the dark phase in BP2 mice (rANOVA:  $F_{11,242} = 1.9$ ,  $p = 0.04$ ). For delta activity, no Genotype effect ( $F_{1,18} \leq 0.7$ ,  $p \geq 0.4$ ) or

Genotype-by-Interval interaction ( $F_{5/7,90/126} \leq 1.1$ ,  $p \geq 0.4$ ) was found for BP1, but a significant Genotype-by-Interval interaction was found for the dark phase in BP2 ( $F_{5,105} = 3.8$ ,  $p = 0.005$ ;  $t$  test:  $*p = 0.02$ ). For sigma activity, no Genotype effect (BP1:  $F_{1,18} \leq 0.4$ ,  $p \geq 0.5$ ; BP2:  $F_{1,21/22} \leq 3.1$ ,  $p \geq 0.09$ ) or Genotype-by-Interval interaction (BP1:  $F_{5/7,90/126} \leq 0.8$ ,  $p \geq 0.08$ ; BP2:  $F_{5/7,105/154} \leq 1.2$ ,  $p \geq 0.3$ ) was found. Grey backgrounds indicate the 12-h dark period.

**Figure 3.5. Expression of target genes after SD in the prefrontal cortex of *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> (BP1<sup>-/-</sup>) and *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> (BP2<sup>-/-</sup>) mice.** Relative levels of steady-state mRNA were measured by qPCR under undisturbed conditions (Ctrl: BP1<sup>-/-</sup> n = 6, BP1<sup>+/+</sup> n = 3, BP2<sup>-/-</sup> n = 9, BP2<sup>+/+</sup> n = 8) or after a 6h sleep deprivation (SD: BP1<sup>-/-</sup> n = 5, BP1<sup>+/+</sup> n = 5, BP2<sup>-/-</sup> n = 8, BP2<sup>+/+</sup> n = 8). In BP1 mice, a significant SD effect was found for *Arc*, *Fos*, *Homer1a* and *Eif4ebp2* (fANOVA:  $F_{1,15} \geq 9.95$ ,  $*p < 0.007$ ) as well as for *Eif4ebp1* ( $t$  test:  $t = 6.1$ ,  $**p = 0.0009$ ), but not for *Bdnf* (fANOVA:  $F_{1,15} = 2.3$ ,  $p = 0.15$ ). Also, a significant Genotype-by-SD interaction was found for *Nrxn3* (fANOVA:  $F_{1,15} = 5.5$ ,  $p = 0.03$ ;  $\Delta$ :  $p = 0.01$  compared to Ctrl). In BP2 mice, only significant SD effects were found for *Arc*, *Bdnf*, *Fos* and *Homer1a* (fANOVA:  $F_{1,28-30} \geq 4.9$ ,  $*p \leq 0.04$ ).

**Table 1. Sequence of primers and probes, and reference number of probe sets used for qPCR.**

<b>Gene Name</b>	<b>Direction</b>	<b>Life Technologies Reference Number or Sequence 5' to 3'</b>	<b>GenBank Accession Number</b>
<i>Actin</i>	fwd	CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT	NM_007393
	rev	CACAGCCTGGATGGCTACGT	
	probe	TTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG	
<i>Arc</i>		Mm00479619_g1	NM_018790.3
<i>Bdnf</i>		Mm04230607_s1	NM_007540.4
<i>Eif4ebp1</i>		Mm04207378_g1	NM_007918.3
<i>Eif4ebp2</i>		Mm00515675_m1	NM_010124.2
<i>Fos</i>		Mm00487425_m1	NM_010234.2
<i>GusB</i>	fwd	ACGGGATTGTGGTCATCGA	NM_010368
	rev	TGACTCGTTGCCAAACTCTGA	
	probe	AGTGTCCCGGTGTGGGCATTGTG	
<i>Homer1a</i>	fwd	GCATTGCCATTTCCACATAGG	NM_011982
	rev	ATGAACTTCCATATTTATCCACCTTACTT	
	probe	ACACATTCAATTCAGCAATCATGA	
<i>Nrxn1</i>		Mm00660298_m1	NM_020252.3
<i>Nrxn2</i>		Mm01236851_m1	NM_001205234.1
<i>Nrxn3</i>		Mm04279482_m1	NM_001198587
<i>Rps9</i>	fwd	GACCAGGAGCTAAAGTTGATTGGA	NM_029767
	rev	TCTTGCCAGGGTAAACTTGA	
	probe	AAACCTCACGTTTGTTCGGAGTCCATACT	
<i>Tbp</i>	fwd	TTGACCTAAAGACCATTGCACTTC	NM_013684
	rev	TTCTCATGATGACTGCAGCAAA	
	probe	TGCAAGAAATGCTGAATATAATCCCAAGCG	



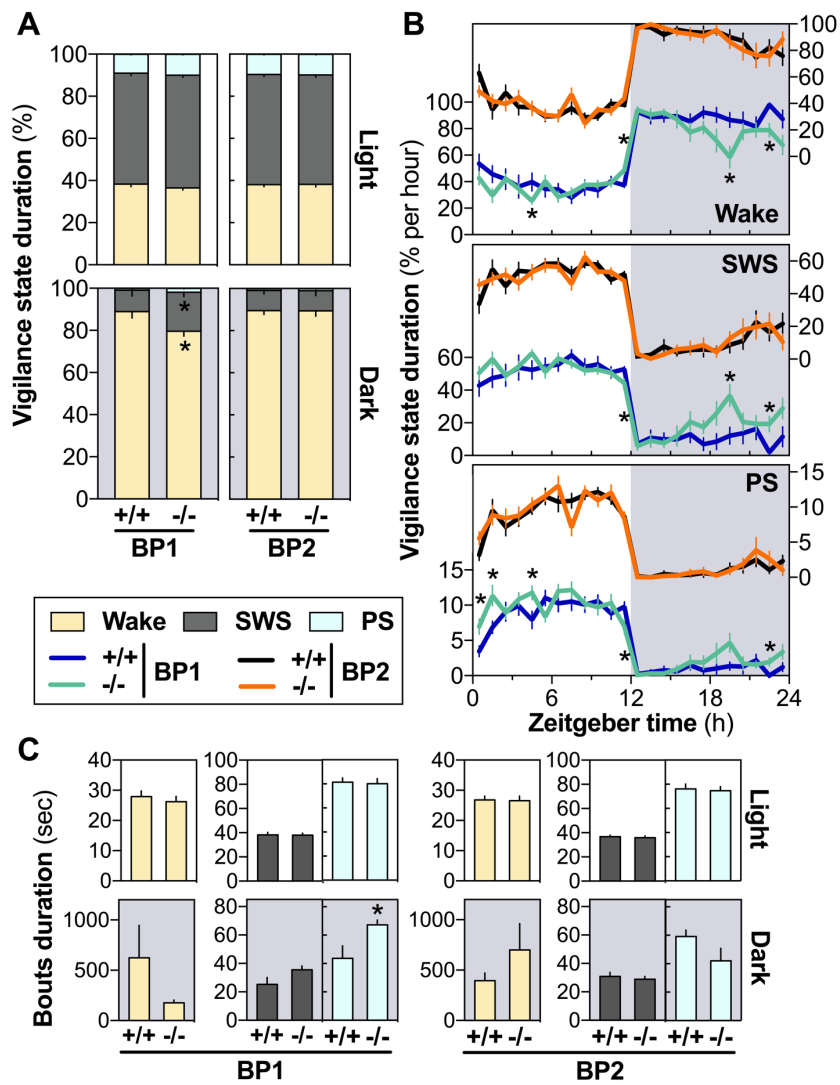


Figure 3.1 (figure 1 dans l'article)

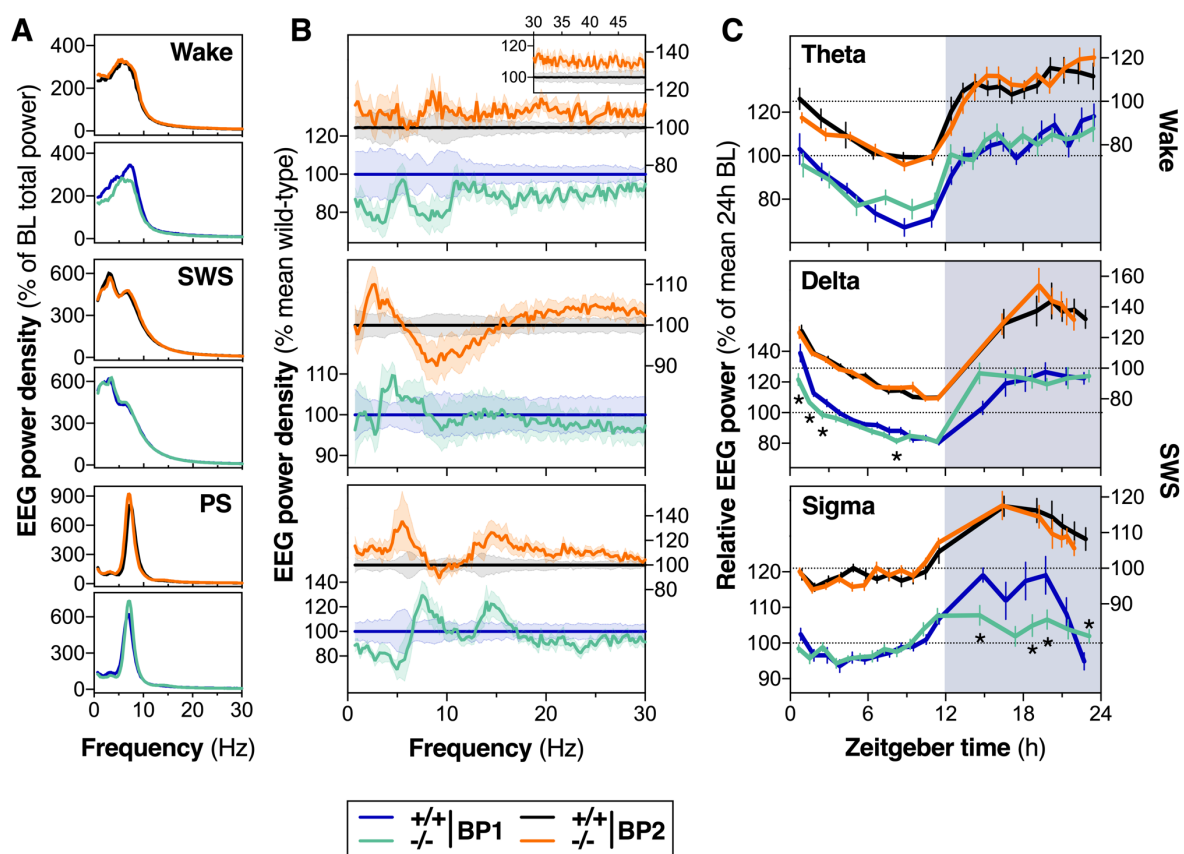


Figure 3.2 (figure 2 dans l'article)

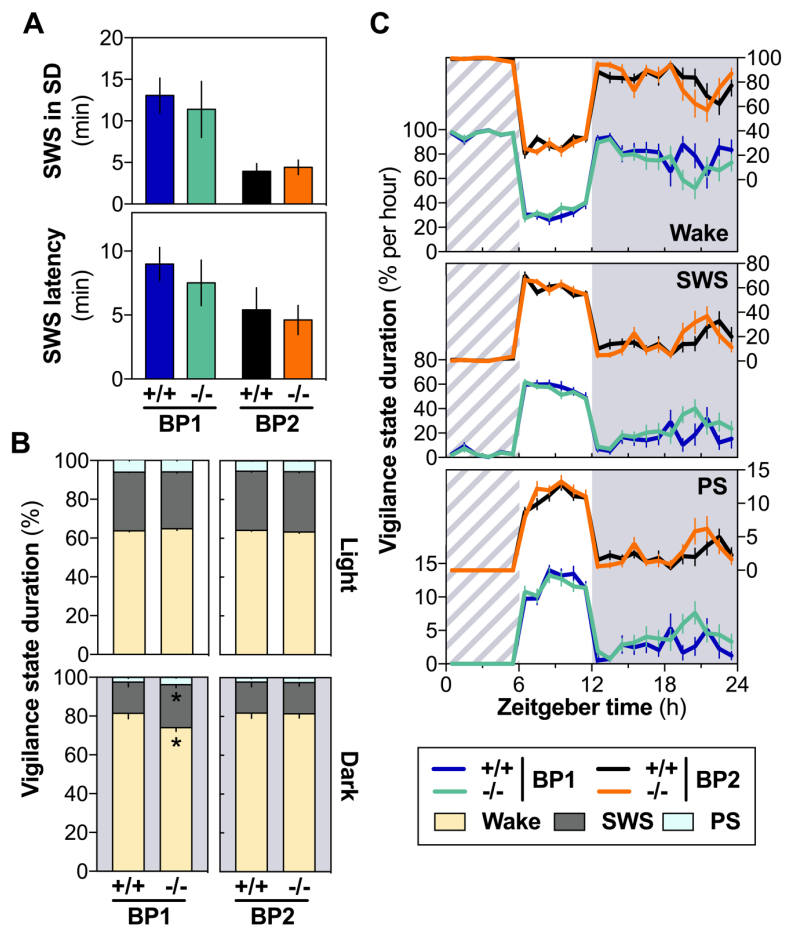


Figure 3.3 (figure 3 dans l'article)

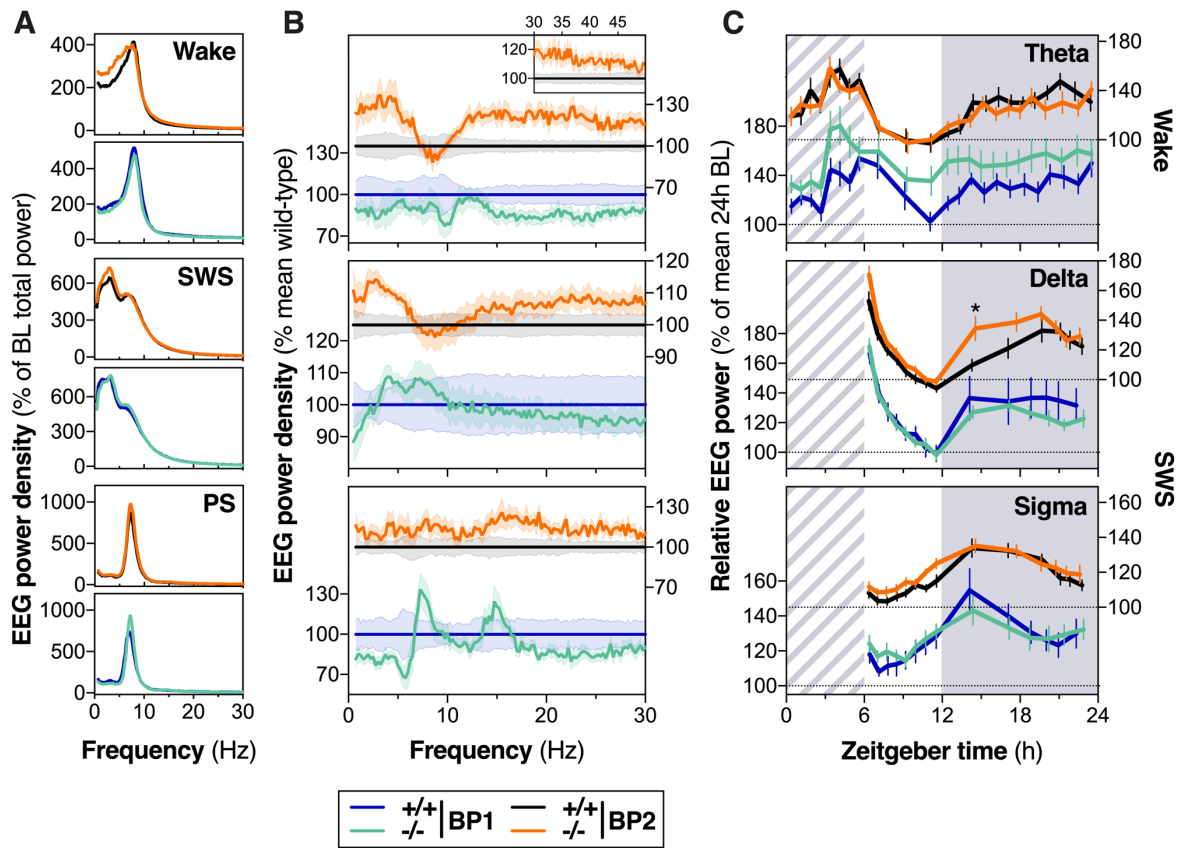


Figure 3.4 (figure 4 dans l'article)

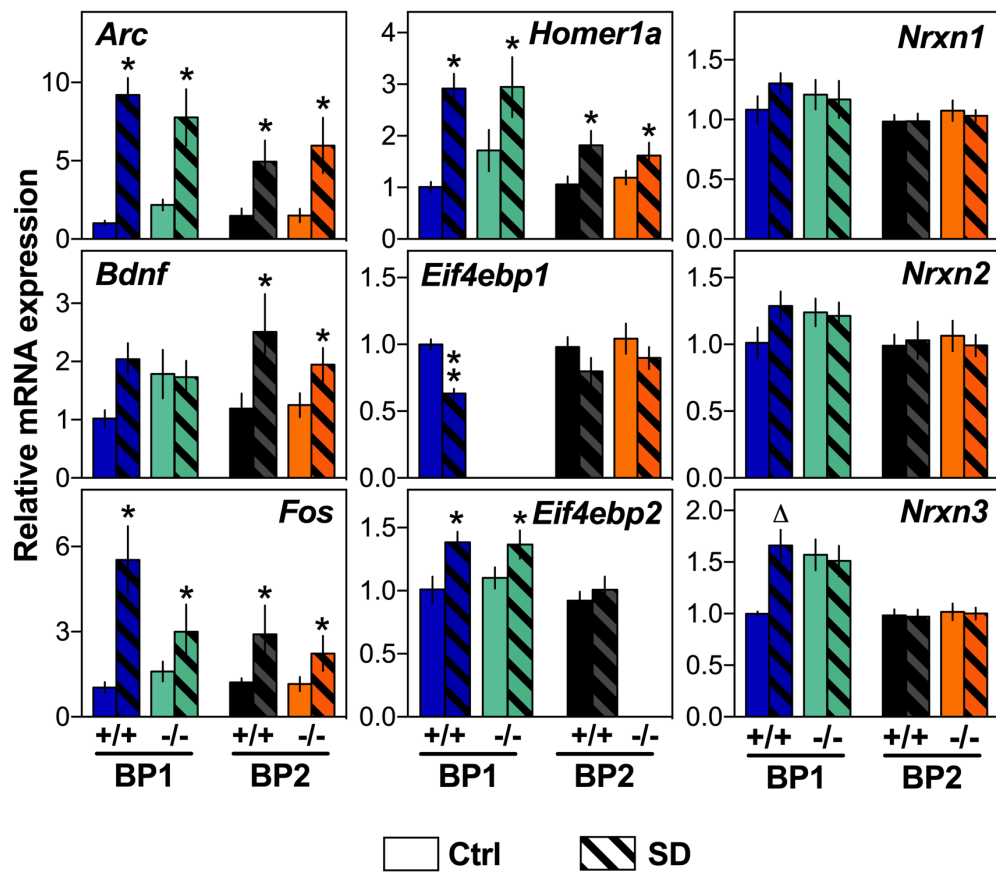


Figure 3.5 (figure 5 dans l'article)

## Chapitre 4 - Discussion

### 4.1 Résumé des résultats de recherche

Par l'enregistrement de l'activité EEG en sommeil et en éveil, en condition contrôle et suivant une privation de sommeil, et par la mesure de transcrits dans le cortex préfrontal après privation de sommeil, nous voulions étudier le rôle des répresseurs de la traduction 4E-BP1 et 4E-BP2. Ainsi, les objectifs spécifiques de cette étude étaient de déterminer l'impact de l'absence de 4E-BP1 et 4E-BP2 sur l'architecture du sommeil et l'activité EEG ainsi que d'évaluer la contribution des deux inhibiteurs de la traduction dans les réponses EEG et moléculaire à la privation de sommeil.

Nous avons observé que les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> passent plus de temps en SLP durant leur période active, le tout associé à une baisse concomitante de l'éveil, contraire à ce qui avait été avancé comme hypothèse. En effet, nous pensions que l'augmentation de l'expression du neuropeptide VIP chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> [178] entrainerait plus d'éveil. Ces résultats ont été observés en conditions de base et suite à la privation de sommeil. Les souris *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> ne montrent quant à elles aucune différence pour la quantité d'éveil. De plus, les variables reliées à la consolidation de l'éveil et du sommeil, notamment des épisodes allongés et une baisse des transitions entre les stades, sont préservées en l'absence de 4E-BP1 ou 4E-BP2.

Au niveau de l'activité spectrale, la mutation 4E-BP1 diminue la puissance de l'activité spectrale corticale en éveil et en SP, alors que la mutation 4E-BP2 tend à l'augmenter. Ces résultats qui concernent le 24h en conditions contrôle sont toutefois non significatifs. L'effet de la mutation *Eif4ebp2* s'est révélé suite à la privation de sommeil, où les souris mutantes présentaient plus de puissance spectrale durant l'éveil et le SP. Au niveau de la progression sur 24h de l'activité spectrale dans des bandes de fréquences définies, nous avons observé une diminution de l'activité delta au début de la période de lumière, indiquant une baisse possible de la pression homéostatique au sommeil chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup>. Ces souris semblent aussi présenter un affaissement de la dynamique de l'activité sigma durant la période d'activité. Inversement, l'activité spectrale sur 24h n'est pas influencée par la mutation *Eif4ebp2*. Finalement, la mesure de l'ARNm au niveau du cortex préfrontal a montré que l'absence de 4E-BP1 modifiait les changements d'expression suite à la privation de sommeil alors que l'absence de 4E-BP2 n'a eu aucun effet. Contrairement à nos hypothèses, l'expression moins importante de *Eif4ebp1* dans le cerveau [184] entraîne une plus

grande différence dans l'activité EEG en conditions de base, et altère l'expression génique suivant la privation de sommeil.

Ces résultats démontrent une implication spécifique des inhibiteurs de la traduction 4E-BP1 et 4E-BP2 dans la régulation du sommeil, quoique modérée, et suggèrent que leurs effets seraient différentiels. Ils pointent ainsi une influence bidirectionnelle. En effet, il a déjà été montré que le sommeil et la privation de sommeil modifient l'expression de la machinerie de traduction protéique [200,241,266], et nos résultats indiquent que cette même machinerie joue un rôle dans la quantité et dans la qualité de l'éveil et du sommeil.

## **4.2 Rôle des répresseurs traductionnels 4E-BP1 et 4E-BP2, et de la kinase mTOR dans la régulation du sommeil**

### **4.2.1 Implication de *Eif4ebp1* dans l'architecture du sommeil**

Malgré le fait que la protéine 4E-BP1 soit beaucoup moins exprimée au niveau du cerveau que 4E-BP2 [187], son absence a eu un plus grand impact sur l'architecture du sommeil que l'absence de *Eif4ebp2*. La mutation de *Eif4ebp1* a résulté en plus de sommeil en condition contrôle et suite à la privation de sommeil, surtout durant la période d'obscurité. Les NSC sont importants pour l'architecture du sommeil et de l'éveil. En effet, comme mentionné dans l'introduction, les NSC, notamment par leurs projections transitant par le DMH, régulent le réseau de l'éveil et du sommeil [114,117,118]. Nous savons également que la présence de 4E-BP1 est essentiel au bon fonctionnement des NSC [178]. Chez le rongeur, à la fois une lésion des NSC [274] ou du DMH [118] abolit la rythmicité circadienne du cycle veille-sommeil. Au lieu d'avoir un sommeil concentré lors du jour, les animaux lésionnés présentent autour de 50% de SLP à chaque heure. Le DMH projette massivement vers le VLPO [114], le LC [116] et les neurones à ORX du LH [115,119]. Il est donc possible que l'altération du rythme circadien chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> [178] découle en des projections circadiennes déficitaires, notamment vers le LH, ce qui pourrait diminuer la quantité d'éveil durant une certaine période du 24h.

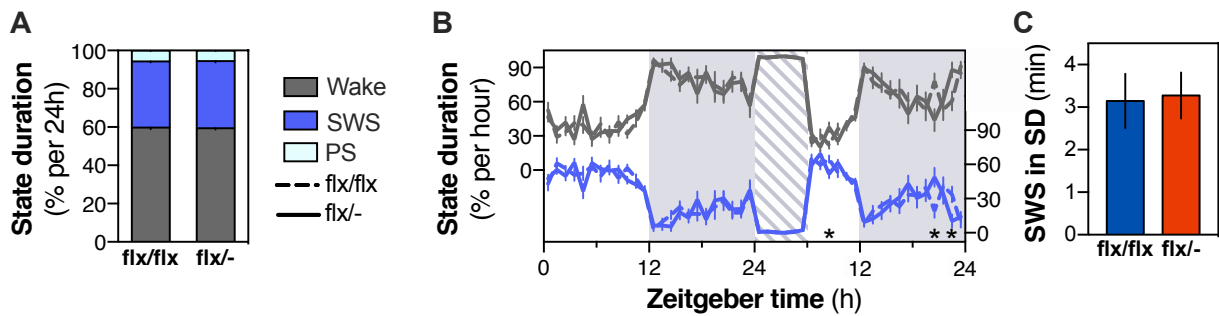
De plus, les NSC régulent la phase circadienne de la sécrétion du neuropeptide ORX des neurones à ORX du LH [275]. Ce neuropeptide est produit exclusivement dans le LH, et agit via des projections ascendantes vers le cortex, mais aussi en stimulant des régions du SRAA, incluant le LC [90]. ORX est nécessaire pour une consolidation de l'éveil et une architecture normale du sommeil, comme le démontre l'impact de l'absence du gène chez les souris [276] et chez les

patients narcoleptiques [277]. La mutation du gène *orx* augmente la durée de SP ainsi que la durée des épisodes de SP uniquement durant le 12h d'obscurité [276]. Cela rappelle ce qui a été observé chez nos souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> : une augmentation de la durée des épisodes de SP en obscurité, associé à une quantité de SP augmentée sur le 24h (données non représentées : test  $t$  :  $t = -2,5$ ;  $p = 0,02$ ), avec tendance pour le 12h d'obscurité (test  $t$  :  $t = -2,0$ ;  $p = 0,06$ ). Encore, puisque les neurones à ORX favorisent le passage vers l'éveil, il est possible que les projections déficitaires en provenance du NSC chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> modifient la transmission orexinergique spécifiquement durant la période active, menant à moins de temps passé en éveil et plus de temps en SP durant ce temps circadien. En conclusion, l'implication de 4E-BP1 dans la régulation de l'éveil/sommeil pourrait passer par son action au niveau des NSC et des neurones du LH.

#### 4.2.2 Effet de l'absence de *Eif4ebp2* sur l'architecture du sommeil

Contrairement à notre hypothèse basée sur l'association entre 4E-BP2 et les comportements autistiques, l'absence de 4E-BP2 n'a pas causé un phénotype sommeil similaire à celui des patients souffrant d'un TSA, c'est-à-dire moins de SLP et un sommeil fragmenté [253,254]. Il semble que la mutation ait peu d'impact sur l'architecture du sommeil, puisque les souris *Eif4ebp2*<sup>+/+</sup> et *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> ont une quantité d'éveil et de sommeil similaires. En plus du SRAA décrit par Moruzzi et Magoun en 1949 [79], comprenant notamment le LC, le DR, le PB et le LH, les neurotransmetteurs rapides (GABA et glutamate) jouent un rôle prépondérant dans le contrôle des états de vigilance. Les neurones glutamatergiques font la promotion de l'éveil [95-97], alors que les populations neuronales GABAergiques ont un rôle mixte selon les régions. Par exemple, au sein de la PZ, le GABA facilite le SLP [111,112], alors que les neurones GABAergiques à PV du BF favorisent l'éveil [93,94]. Les résultats observés chez les souris *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> pourraient indiquer un rôle subsidiaire du répresseur traductionnel au niveau des régions impliquées dans la régulation de l'éveil et du sommeil. Il serait également possible que 4E-BP2 ait un effet sur l'éveil/le sommeil uniquement via les neurones GABAergiques, comme c'est le cas pour les comportements de type autistique [210]. En effet, il a été démontré récemment que les comportements autistiques vus chez les souris 4E-BP2<sup>-/-</sup> [206] découlent uniquement de la mutation dans les interneurones GABAergiques, puisque l'absence de la protéine dans les astrocytes ou les neurones glutamatergiques corticaux ne modifie pas la stéréotypie, la sociabilité et la communication [210]. Considérant le rôle opposé du GABA (i.e. selon la région du cerveau) sur l'induction des états de vigilance, un effet éventuel de 4E-BP2 pourrait être annulé, puisque la mutation touche toutes les cellules neurales.





**Figure 4.1. Architecture du sommeil chez les souris  $mTOR^{flx/flx}$  (n=9) et  $mTOR^{flx/-}$  (n=9).** (A) Proportion du temps passé en éveil (wake), en sommeil lent profond (SWS) et en sommeil paradoxal (PS) durant le 24h baseline. Aucune différence n'a été observée pour la quantité d'éveil et de sommeil entre les deux groupes (test  $t$  :  $-0,4 < t < 0,42$ ;  $p > 0,7$ ). Le graphique du 24h de récupération a été omis, aucune différence n'a été observée pour les trois états de vigilance (test  $t$  :  $-0,4 < t < 0,05$ ;  $p > 0,7$ ). (B) Proportion du temps passé en éveil (axe y gauche, courbes grises) et en sommeil lent profond (axe y droit, courbes mauves) par heure, pour le 48h d'enregistrement. Aucun effet du génotype ( $F_{1,16} < 0,2$ ;  $p > 0,7$ ) ni aucune interaction (rANOVA :  $F_{23,368} < 1,0$ ;  $p > 0,5$ ) n'ont été trouvés pour le premier 24h pour les trois stades de vigilances. Une interaction génotype-par-heure a été trouvée en éveil et en SLP pour la période de récupération (rANOVA :  $F_{23,368} > 2,1$ ;  $p < 0,01$ ). Les souris  $mTOR^{flx/-}$  ont été moins éveillées à ZT9 et ZT23, et plus éveillées à ZT21 (test  $t$  :  $t \pm 2,6$ ;  $p < 0,02$ ). (C) La quantité de SLP pendant la privation de sommeil (SD) n'était pas différente entre les groupes (test  $t$  :  $t = -0,2$ ;  $p = 0,9$ ). L'arrière-plan gris représente le 12h d'obscurité. La privation de sommeil est imagée par l'arrière-plan hachuré.

#### 4.2.3 Impact de l'absence de *mtor* sur l'architecture du sommeil

Les résultats des souris *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> sont identiques à ceux que nous avons observés chez les souris  $mTOR^{flx/-}$ . En effet, en plus d'étudier les protéines 4E-BP1 et 4E-BP2, nous avons aussi regardé l'implication de la kinase mTOR en sommeil dans le contexte de mon projet de maîtrise, afin de mieux comprendre les effets des répresseurs de la traduction et de valider si ces effets étaient médiés par leur kinase régulatrice, mTOR. Des souris sauvages et hétérozygotes mutantes pour mTOR (voir Annexe 1 pour plus d'information) ont été implantées avec des électrodes EEG/EMG et enregistrées de la même manière que les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> et 4E-BP2<sup>-/-</sup>. Comme pour les deux autres groupes, une privation de sommeil de 6h a été effectuée au début de la deuxième journée d'enregistrement. La mutation inactive mTOR, rendant 4E-BP1 et 4E-BP2 hypophosphorylés. Ils peuvent donc séquestrer eIF4E, ce qui diminue la traduction protéique. Inversement, l'absence de 4E-BP1 ou 4E-BP2 chez nos souris mime une suractivation de mTOR, qui induirait une hyperphosphorylation des inhibiteurs de la traduction, et donc une augmentation de la traduction. Les souris  $mTOR^{flx/-}$  sont viables, de taille et de poids normaux, et sont indistinguables des souris sauvages [214]. De façon étonnante, les souris hétérozygotes ne présentent aucune atteinte de la L-LTP ni de la mémoire à long terme [264]. Malgré le fait que mTOR soit exprimé de façon ubiquitaire, la délétion d'un allèle n'a eu aucun impact sur l'architecture du sommeil; la quantité d'éveil, de SLP et de SP était équivalente entre les souris  $mTOR^{flx/flx}$  et  $mTOR^{flx/-}$  avant la

privation de sommeil (Figure 4.1A) et suivant la privation de sommeil (données non représentées, test  $t$  :  $-0,4 < t < 0,05$ ;  $p > 0,7$ ). Comme statué précédemment, ces résultats sont conséquents avec le peu de changements observés chez les souris *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> et pourraient être expliqués par un rôle marginal de la voie mTOR-4E-BP2 dans les régions du tronc et de l'hypothalamus contrôlant la durée de l'éveil et du sommeil.

### **4.3 Modifications de l'activité EEG en condition contrôle et suivant la privation de sommeil**

Nos résultats indiquent en second lieu que les mutations *Eif4ebp1*, *Eif4ebp2* et *mtor* ont eu un effet sur la qualité de l'activité EEG, relevée par une analyse spectrale des signaux EEG. Cette analyse a été effectuée sur les signaux en condition contrôle et suivant la privation de sommeil. En plus d'aider à comprendre le rôle du sommeil, la privation permet d'augmenter la pression homéostatique au sommeil afin d'évaluer la réponse du cerveau à ce défi homéostatique [68]. Elle est réalisée en gardant les souris éveillées à un moment où elles sont normalement endormies, c'est-à-dire au début de la période de lumière.

#### **4.3.1 Chez les souris mutantes pour les répresseurs de la traduction 4E-BP1 ou 4E-BP2**

Premièrement, en ce qui concerne l'éveil, l'absence des répresseurs de la traduction semble avoir un effet opposé sur la puissance spectrale. En effet, la mutation de 4E-BP1 tendait à diminuer la puissance spectrale, tandis que l'absence de 4E-BP2 causait une augmentation généralisée de celle-ci. Ce résultat peut paraître surprenant compte tenu de leur rôle similaire dans la traduction dépendante de la coiffe 5' [150] et l'organisation corticale [181,251]. Par ailleurs, il a été montré que la traduction des *Nlgn*, une famille de molécules d'adhésion synaptique, est régulée de façon similaire par 4E-BP1 et 4E-BP2. Situées en post-synaptique, les NLGN interagissent avec leur partenaire présynaptique, les neurexines. Chez les souris, on retrouve quatre gènes encodant les NLGN (*Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* et *Nlgn4*), qui possèdent des localisations et spécialisations cellulaires différentes [278]. NLGN1 est important pour l'homéostasie de la synapse glutamatergique, et son expression est nécessaire pour une L-LTP normale [279]. De façon conséquente, sa surexpression par le manque de 4E-BP1 dans les neurones spinaux induit une augmentation de la transmission synaptique excitatrice [179], et la normalisation de son expression corrige le ratio excitation/inhibition dans les neurones hippocampiques 4E-BP2<sup>-/-</sup> [208]. Une

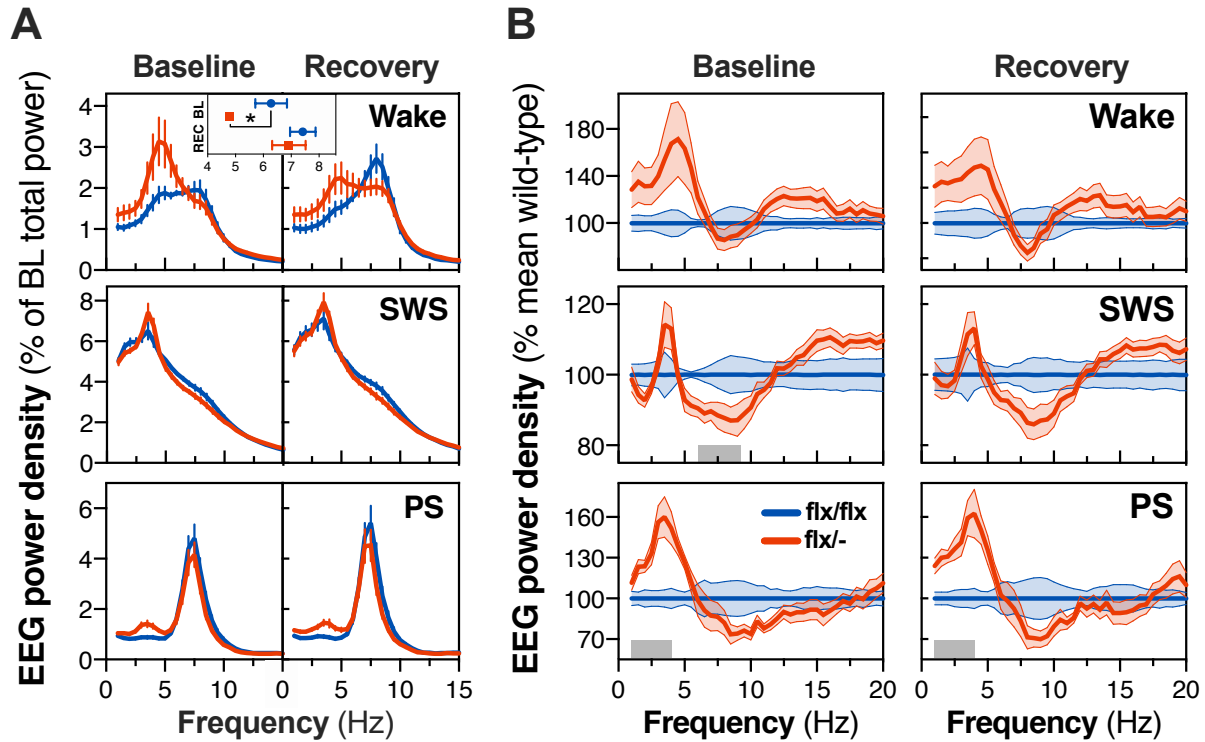
augmentation de *Nlgn1* dans le système nerveux central devrait, en théorie, augmenter la puissance spectrale dans les bandes de fréquence thêta et alpha durant l'éveil, puisque les souris *Nlgn1*<sup>-/-</sup> présentent une baisse de puissance dans ces fréquences [273]. Le fait que les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> montrent une propension vers la diminution dans les fréquences thêta suggérerait un mécanisme indépendant de *Nlgn1*.

Deuxièmement, chez les souris *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup>, la tendance à l'augmentation de la puissance spectrale généralisée durant l'éveil en condition contrôle et qui devient significative pendant la journée de récupération pourrait être liée à l'altération de la transmission synaptique chez ces souris. Elles présentent une facilitation de la L-LTP et un ratio excitation/inhibition augmenté au niveau de l'hippocampe [184,208]. Malgré le fait que la transmission inhibitrice soit augmentée chez ces souris, la transmission basale excitatrice l'est encore plus, expliquant l'augmentation du ratio E/I [208]. Des modèles mathématiques ont montré que le contrôle local du ratio E/I impacte l'activité électrique globale du cerveau [280]. De façon intéressante, il semble que le ratio E/I d'une région corticale donnée soit sous influence circadienne chez l'humain [281]. Les oscillations neurales synchrones dans les basses et hautes fréquences sont fondamentales pour le fonctionnement normal du cerveau, notamment dans la LTP. Par exemple, la stimulation au pic de l'onde thêta dans l'hippocampe favorise la LTP, alors que la stimulation dans le creux favorise la LTD [282]. La même association se voit dans les bandes de fréquences gamma et bêta [283], indiquant que les oscillations fournissent une structure temporelle permettant l'alignement ou non de l'activation pré-synaptique et post-synaptique, permettant de déterminer un renforcement ou une dépression des contacts synaptiques [284]. Conséquemment, la synchronie neuronale est importante pour former les circuits neuronaux durant le développement et son altération est, par exemple, associée à la pathogenèse de la schizophrénie et l'autisme [285,286]. Les neurones GABAergiques corticaux jouent un rôle prépondérant dans la génération de réseaux oscillatoires synchronisés [287], que ce soit pour les ondes lentes [288] ou l'activité gamma [289]. Il est donc possible que l'altération du ratio E/I contribue à la synchronisation corticale plus grande observée chez nos souris en éveil et en SP. La mutation de *Eif4ebp2* dans les interneurons corticaux pourrait permettre de valider cette possibilité. De plus, si, comme 4E-BP1, 4E-BP2 est impliqué dans les rythmes circadiens, il est possible que l'absence de cette protéine contribue à une plus grande synchronie corticale qui varie selon le temps de la journée. Il serait important dans un premier temps de valider si 4E-BP2 possède une régulation circadienne afin d'explorer cette hypothèse.

### 4.3.2 Chez les souris mutantes pour la kinase mTOR

Troisièmement, pour l'analyse spectrale chez les souris mTOR, l'absence d'une copie du gène a modifié la qualité de l'EEG durant les premiers 24h d'enregistrement de façon plus importante que ce qui a été observé chez les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> et 4E-BP2<sup>-/-</sup>. En éveil, la mutation a eu un impact sur la distribution des basses fréquences (figure 4.2A, panneau de gauche). En effet, le pic principal est décalé vers les basses fréquences chez les souris mTOR<sup>flx/-</sup> (mTOR<sup>flx/flx</sup> = 6,3 ± 1,7; mTOR<sup>flx/-</sup> = 4,8 ± 0,4;  $p = 0,02$ ). Le spectre de l'éveil est normalement caractérisé par une contribution variable des puissances entre 3 et 10 Hz, en faisant un stade très diversifié [17]. Il semblerait que la mutation ralentisse l'activité neuronale dans les basses fréquences. mTOR, par l'inhibition via la phosphorylation de 4E-BP1, se trouve à favoriser la traduction du neuropeptide VIP. Chez les souris mTOR<sup>flx/-</sup>, VIP est diminué de 50% dans les NSC [178]. VIP possède un rôle dans la régulation des décharges toniques au niveau des neurones thalamocorticaux en éveil et en SP [271,272]. Il est possible qu'un manque de VIP dans ces neurones empêche l'établissement de décharges toniques franches, ce qui maintient les décharges en bouffée qui sous-tendent les ondes lentes [6,9]. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en enregistrant le sommeil chez des souris n'exprimant pas la kinase mTOR spécifiquement dans les neurones VIP [250].

L'EEG en SLP des souris mTOR<sup>flx/-</sup> était caractérisé par moins d'activité en thêta ( $F_{4,64} = 3,4$ ;  $p = 0,02$ ; test  $t$  :  $p = 0,009$ ; Figure 4.2B). Chez les rongeurs, les rythmes thêta se produisent de façon continue en éveil actif et en SP, et sont impliqués dans la formation de la mémoire [290]. Les circuits sous-corticaux impliqués dans la genèse et la régulation des oscillations thêta sont multiples. Mais principalement, la population des neurones GABAergiques du MS, due à leur rythmicité intrinsèque, génère le rythme thêta hippocampique [19]. En contrepartie, les autres populations du MS (cholinergiques et glutamatergiques) ne sont pas directement impliquées dans la genèse du rythme thêta, mais participent à sa régulation et sa synchronisation [291,292]. Le rôle du thêta en SLP n'a pas été beaucoup étudié, mais il est possible qu'il soit important pour la consolidation mnésique, notamment des mémoires émotionnelles [293]. Chez l'humain, il semble que le rythme thêta en sommeil NREM serve à la réactivation et à la réorganisation des mémoires [294]. Il n'est pas connu si le même phénomène se produit chez les souris, mais la baisse d'activité thêta chez les souris mTOR<sup>flx/-</sup> pourrait être associée à des déficits mnésiques chez ces souris, compte-tenu de l'importance de cette voie ubiquitaire dans la mémoire et la LTP [184,211,295].



**Figure 4.2. Activité spectrale EEG en conditions de base, pendant et après privation de sommeil chez les souris  $mTOR^{flx/flx}$  et  $mTOR^{flx/-}$ .** (A) Puissance spectrale relative sur le 24h en éveil (wake), SLP (SWS) et SP (PS); en conditions de base (Baseline [BL]; panneaux de gauche), et pendant et après privation de sommeil (Recovery; panneaux de droite). L'insert représente la fréquence moyenne du pic ayant la puissance maximale en éveil de chaque souris  $mTOR^{flx/flx}$  et  $mTOR^{flx/-}$ , calculée pour la période pré- (BL, test  $t$  :  $t = 2,5$ ;  $p = 0,02$ ) et post- privation (REC, test  $t$  :  $t = 0,7$ ;  $p = 0,5$ ) de sommeil. Les fréquences supérieures à 15 Hz ont été omises. (B) Puissance spectrale représentée selon le pourcentage moyen des souris  $mTOR^{flx/flx}$  en éveil, SLP et SP. En conditions de base (panneaux de gauche), la puissance spectrale de  $mTOR^{flx/flx}$  et  $mTOR^{flx/-}$  ne diffère pas significativement en éveil (rANOVA, interaction génotype par bande de fréquence :  $F_{4,64} = 1,8$ ;  $p = 0,1$ ). En SLP, les souris  $mTOR^{flx/-}$  avaient moins de puissance spectrale en thêta (5-9 Hz) (rANOVA, interaction génotype par bande de fréquence :  $F_{4,64} = 3,4$ ;  $p = 0,02$ ; test  $t$  :  $t = 2,9$ ;  $p = 0,009$ ). En SP, une augmentation de la puissance en delta (1-4Hz) a été observée chez les souris  $mTOR^{flx/-}$  comparativement aux souris  $mTOR^{flx/flx}$  (rANOVA, interaction génotype par bande de fréquence :  $F_{4,64} = 7,6$ ;  $p = 0,0002$ ; test  $t$  :  $t = -4,0$ ;  $p = 0,001$ ). Pendant et suivant la privation de sommeil (panneaux de droite), la puissance spectrale de  $mTOR^{flx/flx}$  et  $mTOR^{flx/-}$  ne diffère pas significativement en éveil ni en SLP (rANOVA, interaction génotype-par-bande de fréquence :  $F_{4,64} > 2,1$ ;  $p < 0,09$ ). En SP, les souris  $mTOR^{flx/-}$  présentaient plus de puissance dans la bande de fréquence delta (rANOVA, interaction génotype par bande de fréquence :  $F_{4,64} = 7,4$ ;  $p = 0,001$ ; test  $t$  :  $t = -4,9$ ;  $p = 0,0002$ ). Les fréquences supérieures à 20 Hz ont été omises. Les différences statistiquement significatives sont indiquées par les bandes grises et l'\*

Les souris  $mTOR^{flx/-}$  présentent également une augmentation de leur puissance delta en SP avant et après la privation de sommeil (Figure 4.2B). L'activité delta à l'EEG est traditionnellement vue comme un marqueur de SLP, mais son implication en SP a été peu étudiée. Une étude récente chez la souris a montré que les ondes lentes survenaient en SP, principalement dans la couche IV des cortex primaires (S1, V1, M1), mais pas dans les aires secondaires associatives [296]. Ce serait un phénomène local, non régulé homéostatiquement comme l'AOL en

SLP. Les mécanismes responsables sont inconnus, mais seraient probablement différents de ceux générant l'AOL en SLP, puisque des enregistrements du thalamus en SP démontrent des propriétés physiologiques se rapprochant de celles en éveil [297]. Il est possible que ces ondes lentes en SP protègent le sommeil, en régulant l'entrée de stimuli dans le cortex, qui se fait par la couche IV via les projections thalamocorticales [296].

Il est à noter que le gène *mtor* encode la kinase mTOR, nécessaire à la formation du complexe mTORC1 et mTORC2. Ainsi, on ne peut exclure une contribution du second complexe aux résultats observés.

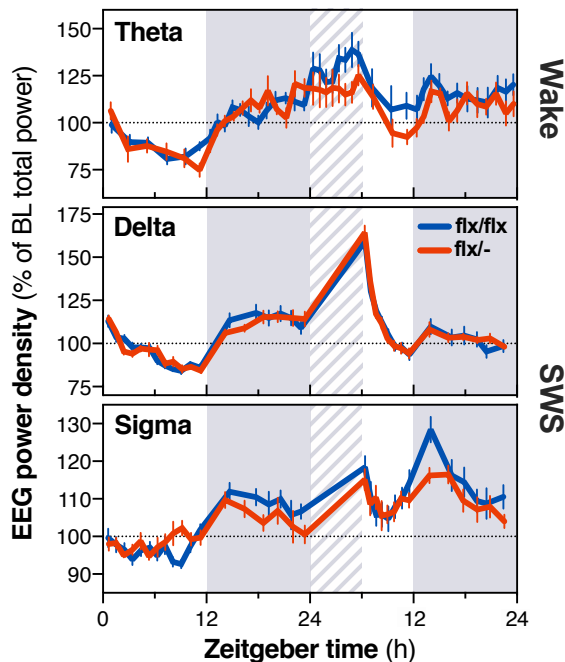
Finalement, une modification des efférences des NSC vers les neurones à ORX pourrait expliquer les altérations du spectre des souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup>, *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> et *mtor*<sup>fix/-</sup>. De façon intéressante, les souris ORX<sup>-/-</sup> présentent plusieurs altérations dans la composition spectrale de l'EEG, comme une baisse marquée de l'activité delta en SLP suivant un éveil spontané, ainsi qu'une baisse de l'éveil dominé par le thêta [18]. La neurotransmission orexinergique active la voie mTORC1 [234], et induit la phosphorylation de 4E-BP1 et S6K en culture [298], bien que cela n'ait pas été démontré *in vivo*. Ces données suggèrent un rôle de la voie mTORC1-4E-BP dans la modulation de l'activité EEG via le système orexinergique.

### 4.3 Distribution de l'activité spectrale sur 24h

Le décours sur 24h de l'activité delta, un marqueur de l'homéostasie du sommeil [26,28], est inchangé par la mutation *mtor* (Figure 4.3), mais est modifié chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup>. Spécifiquement, ces souris mutantes présentent une baisse de l'activité delta au début de la période de lumière, indiquant que moins de pression au sommeil s'est accumulée durant leur période d'activité. Cette pression diminuée peut être expliquée par le fait que les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> ont passé plus de temps en SLP, notamment à la fin de la période d'obscurité. Conséquemment, la pression au sommeil était similaire entre les souris *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> et *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> suivant la privation de sommeil, alors que les souris ont été privées de la même quantité de sommeil durant le 6h. Un phénotype similaire est observé chez les souris ORX<sup>-/-</sup>, où, malgré une pression au sommeil abaissée en condition normale, le rebond d'AOL suite à la privation est normal [18].

De plus, la dynamique du sigma est modifiée chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> durant la période d'activité. L'activité en sigma représente les fuseaux de sommeil, qui sont des oscillations transitoires qui se produisent majoritairement en sommeil léger [299], et qui augmentent au courant de la nuit [300,301]. Les fuseaux de sommeil sont fortement associés à la formation mnésique et

sont souvent augmentés suivant une période d'apprentissage [302-304]. Ils naissent de l'interaction entre les neurones réticulaires thalamiques et les neurones thalamocorticaux, et peuvent survenir en conjonction avec les oscillations delta [300,305]. Notamment, les fuseaux de sommeil et l'activité delta oscillent de façon réciproque en SLP [306,307]. Comme mentionné dans l'introduction, l'activité sigma est sous fort contrôle circadien [64-66]. Ainsi, l'affaissement de l'amplitude de l'activité sigma durant le sommeil chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> pourrait être causée par une dysfonction circadienne entraînant une diminution de la propension circadienne aux fuseaux à ce 'moment circadien'. Cependant, comme les souris ont été exposées à un cycle lumière-obscurité 12h:12h, le rythme circadien est entraîné par la lumière. Par conséquent, les paramètres circadiens ne permettent pas d'inférer sur l'impact du processus C. Afin de révéler la composante circadienne, il est essentiel de retirer le rythme jour/nuit donné par la lumière et d'autres *zeitgebers*. L'étude des souris en condition constante (obscurité constante) permettrait de pallier ce problème. L'absence de mTOR ou de 4E-BP2 n'ont pas modifié le déroulement de l'activité spectrale sur 24h.



**Figure 4.3. Distribution sur 48h de l'activité thêta (6-9Hz) en éveil, de l'activité delta (1-4 Hz) et sigma (10-13 Hz) en SLP chez les souris  $mTOR^{flx/flx}$  et  $mTOR^{flx/-}$ .** Aucun effet significatif de la mutation n'a été trouvé chez les souris  $mTOR^{flx/-}$  pour le 24h de base en éveil (rANOVA :  $F_{17,272} = 1,3$ ;  $p = 0,2$ ) ni en SLP (rANOVA :  $F_{17,272} < 1,6$ ;  $p > 0,6$ ). Également, pendant et suite à la privation de sommeil, aucune différence en éveil n'est apparue (rANOVA :  $F_{22,352} = 0,6$ ;  $p = 0,9$ ) ni en SLP suite à la privation de sommeil (rANOVA :  $F_{13,208} < 1,6$ ;  $p > 0,1$ ). L'arrière-plan gris représente le 12h d'obscurité. La privation de sommeil est imagée par l'arrière-plan hachuré.

## 4.4 Réponse moléculaire à la privation de sommeil

Afin de vérifier la réponse moléculaire à la privation de sommeil, nous avons effectué une analyse de la transcription génique sur le cortex préfrontal, juste sous le site d'enregistrement de l'électrode antérieure. Les répresseurs 4E-BP1 et 4E-BP2 ne régulent pas la transcription, mais sont connus pour traduire des gènes importants dans la régulation de la transcription [308]. Également, nous cherchions à valider la réponse moléculaire homéostatique à la privation au niveau de certains gènes de réponse immédiate, comme *Homer1a* et *Bdnf*, qui sont connus pour augmenter en parallèle avec l'accumulation de l'AOL [44,49]. Cette analyse moléculaire a seulement été effectuée chez les souris 4E-BP1 et 4E-BP2. Idem aux changements opposés observés à l'EEG, l'expression génique des souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> et *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup> était différenciellement impactée par la privation de sommeil. Alors que la privation de sommeil a augmenté les niveaux de *Eif4ebp2* chez les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> et 4E-BP1<sup>+/+</sup> et a diminué le transcrit *Eif4ebp1* chez les souris 4E-BP1<sup>+/+</sup>, celle-ci n'a pas modifié significativement l'expression du transcrit *Eif4ebp1* chez les souris 4E-BP2<sup>-/-</sup>. Dans la même lignée que les modifications au niveau de la puissance spectrale chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> et *Eif4ebp2*<sup>-/-</sup>, ces observations supportent un rôle différent des deux répresseurs de la traduction dans la régulation du sommeil.

En complément, il semble que l'expression génique soit altérée seulement en l'absence de 4E-BP1. L'augmentation attendue suite à la privation de sommeil du transcrit *Bdnf*, un marqueur de la fonction synaptique et de la plasticité [47], n'a pas été observée chez les souris *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup>, probablement due à une expression augmentée en condition contrôle. Il est possible que le transcrit *Bdnf* I, qui est celui recherché dans l'analyse par qPCR, soit régulé différemment chez les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup>. En effet, la traduction de *Bdnf* est régulée notamment par la voie mTOR [309]. BDNF peut ensuite stimuler la traduction protéique de certains ARNm via mTORC1 [229,310], d'une façon localisée dans le neurone [311].

## 4.5 Effets différentiels des répresseurs traductionnels 4E-BP1 et 4E-BP2 dans la régulation du sommeil et de l'éveil

Les données de ce mémoire pointent vers une influence différente de 4E-BP1 et 4E-BP2 sur la structure et la qualité du sommeil et de l'éveil. Les paragraphes qui suivent présenteront diverses hypothèses qui pourraient soutenir ces effets divergents.



Ces rôles distincts pourraient être expliqués par la traduction de sous-groupes spécifiques d'ARNm via leur région 5'UTR. Par exemple, les niveaux de sous-unités GluA1 et GluA2 des récepteurs AMPA sont inchangés chez les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> [179] alors que leur traduction est augmentée chez les souris 4E-BP2<sup>-/-</sup> [205]. Malgré le fait que ces changements aient été mesurés dans deux régions différentes du système nerveux central (neurones spinaux et neurone pyramidaux de l'hippocampe, respectivement), ils indiquent la possibilité que les deux protéines régulent de façon différente la traduction.

En parallèle, les effets distincts des répresseurs pourraient être attribués aux compartiments cellulaires où ils inhibent la traduction. La localisation d'ARNm spécifiques et la traduction protéique aux différents sites spécialisés du neurone permettent de soutenir de nombreuses fonctions cellulaires, comme la synaptogenèse et la plasticité dépendante de l'expérience [312]. À la fois les compartiments pré-synaptiques inhibiteurs et excitateurs, ainsi que les épines dendritiques sont capables de synthèse protéique locale, et possèdent leur propre transcriptome [313]. Il serait possible que les répresseurs 4E-BP1 et 4E-BP2 jouent des rôles non-similaires dans différents compartiments neuronaux, par exemple aux synapses excitatrices et inhibitrices; cela aurait comme conséquence de moduler différemment l'excitabilité neuronale. En lien avec cela, 4E-BP1 serait important à la fois pour le pré- et le post-synaptique dans le neurone spinal, alors que 4E-BP2 serait primordial pour le fonctionnement du compartiment post-synaptique au niveau des synapses excitatrices de l'hippocampe [179,208]. Conséquemment, 4E-BP2 est enrichi aux sites post-synaptiques et dans l'épine dendritique en comparaison à 4E-BP1 [186]. Des transcrits résultant de l'épissage alternatif d'un même ARNm, qui seraient positionnés en des compartiments distincts du neurone, pourraient aussi expliquer l'effet différentiel des répresseurs de la traduction. Par exemple, la vingtaine de transcrits découlant de l'épissage du gène *Bdnf* ont une localisation neuronale qui diffère [311], ainsi que des régions 5'UTR de longueurs variables [314,315]. Il est donc possible que le transcrit *Bdnf* I, qui possède la région 5'UTR la plus longue [315,316], soit traduit par 4E-BP1 ou 4E-BP2 seulement où il est présent, c'est-à-dire aux dendrites proximales et dans le soma [311]. Cette régulation locale de la production BDNF pourrait donc sous-tendre la plasticité structurelle et fonctionnelle [317] à des synapses précises, et par conséquent l'activité électrique de certains réseaux neuronaux. Des études de transcriptomique subséquentes seraient requises pour départager la contribution respective de 4E-BP1 et 4E-BP2. Également, une approche protéomique pourrait éclaircir l'impact des modifications post-traductionnelles (déamidation vs phosphorylation) et leur contribution aux différences observées [188,199].

## 4.6 Limites de l'étude

### 4.6.1 Utilisation de souris ne provenant pas de la même portée

Les souris utilisées pour le groupe 4E-BP1 proviennent de deux colonies indépendantes, une colonie *Eif4ebp1*<sup>-/-</sup> et une *Eif4ebp1*<sup>+/+</sup> élevées séparément sur plusieurs générations. Les résultats obtenus chez ces souris doivent donc être interprétés en conséquence. Ce n'est cependant pas le cas pour les souris 4E-BP2 et mTOR, qui proviennent chacune d'une même colonie. L'utilisation de souris *non-littermates* peut entraîner des différences entre les groupes, non pas à cause de la mutation testée, mais plutôt à cause d'un bagage génétique différent. Cela a pu avoir un effet sur nos données, considérant l'importance de la génétique dans les marqueurs EEG de l'éveil et du sommeil [17,43]. Différentes études ont montré l'influence de l'utilisation de souris *non-littermates* sur l'immunité innée [318,319]. De plus, même si le bagage génétique est identique au départ, l'épigénétique peut modifier subséquemment l'expression génique [320]. Il est donc possible que des conditions d'élevage légèrement différentes ou un stress maternel dans seulement une des colonies aient modifié les marques épigénétiques.

### 4.6.2 Mutation touchant tout le corps

Les souris utilisées dans l'étude comportaient une mutation invalidant le gène dans tout le corps. Il ne peut être exclu que l'absence d'un gène ait mené à des compensations développementales, notamment des autres 4E-BP de la famille puisqu'ils possèdent une expression similaire [187]. Une façon de contrôler pour cela aurait été d'étudier une lignée de souris présentant une double mutation (DKO) [321] ou une triple mutation (TKO) [322]. Les TKO sont plus sensibles à l'obésité induite par une diète riche en gras et présentent des anomalies métaboliques importantes, comme de la stéatose hépatique et une résistance à l'insuline [322]. Il est cependant possible qu'il n'y ait pas ou peu de compensations des autres protéines de la même famille, car les souris 4E-BP1<sup>-/-</sup> et 4E-BP2<sup>-/-</sup> présentent des altérations synaptiques différentes [179,208], et le *knock-down* de 4E-BP2 n'a pas augmenté l'expression de 4E-BP1 dans le cortex et en culture cellulaire [181,251]. De plus, les altérations différentielles de l'expression des transcrits vues suite à la privation de sommeil vont dans cette direction.

Un autre modèle possible aurait été l'utilisation d'un système permettant de restreindre temporellement l'expression, comme le système *Tet-Off* [323]. L'ajout de doxycycline ou tétracycline permet de bloquer la transcription du gène pour la durée des expériences. L'induction du gène n'est

pas affectée en absence de l'antibiotique, permettant le développement normal de la souris. Cependant, l'utilisation de systèmes permettant de restreindre l'expression à un sous-type neuronal, comme le système Cre-Lox, n'aurait pas été souhaitable comme première étape, puisque c'est une étude exploratoire, nécessaire pour évaluer la pertinence d'investigations plus poussées.

## 4.7 Conclusion et perspectives

À la fois le sommeil et la privation de sommeil modifient la synthèse protéine et sa régulation. Il a été montré qu'une période de sommeil augmentait la traduction des protéines dans le cerveau des rats [243] et des primates non humains [242]. De plus, il est démontré que le sommeil est nécessaire pour la consolidation de mémoire dépendante de la synthèse protéique [241,266]. Inversement, le manque de sommeil a des effets délétères sur les fonctions dépendantes de la synthèse protéique [200]. Nos résultats supportent une relation bidirectionnelle entre la machinerie de traduction protéique mTORC1-4E-BPs et l'éveil/sommeil. En effet, nous avons montré que l'absence des répresseurs de la traduction ainsi que de la kinase mTOR impacte la qualité de l'éveil et du sommeil. De plus, seulement l'absence de *Eif4ebp1* modifie la quantité d'éveil et de sommeil.

Il serait maintenant important d'étudier la contribution spécifique de la machinerie de traduction au niveau des structures régulant l'éveil et le sommeil. Cette avenue permettrait également de comprendre l'implication des répresseurs de la traduction dans la pathophysiologie des troubles de sommeil associés aux mTOR-opathies, comme la sclérose tubéreuse de Bourneville [324].

# Bibliographie

1. R. Berger J, A. Vilensky J: **Encephalitis lethargica (von Economo's encephalitis)**. In *Neurovirology*. Edited by Tselis AC, Booss J: Elsevier; 2014:745-761. Handbook of Clinical Neurology, vol 123.]
2. Deboer T: **Behavioral and Electrophysiological Correlates of Sleep and Sleep Homeostasis**. In *Sleep, Neuronal Plasticity and Brain Function*. Edited by Meerlo P, Benca RM, Abel T: Springer Berlin Heidelberg; 2015:1-24. [Geyer MA, Ellenbroek BA, Marsden CA, Barnes TRE (Series Editor): Curr Top Behav Neurosci, vol 25.]
3. Faradji H, Cespuglio R, Jouvet M: **Phasic events of paradoxical sleep in the anophthalmic ZRDCT/An mice**. *Physiol Behav* 1981, **26**:961-965.
4. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ: **Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain**. *Science* 1993, **262**:679-685.
5. Steriade M: *Neuronal Substrates of Sleep and Epilepsy*. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.
6. Steriade M, Dossi RC, Nunez A: **Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression**. *J Neurosci* 1991, **11**:3200-3217.
7. Chauvette S, Crochet S, Volgushev M, Timofeev I: **Properties of Slow Oscillation during Slow-Wave Sleep and Anesthesia in Cats**. *J Neurosci* 2011, **31**:14998.
8. McCormick DA, Pape HC: **Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones**. *J Physiol* 1990, **431**:291-318.
9. Dossi RC, Nunez A, Steriade M: **Electrophysiology of a slow (0.5-4 Hz) intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurones in vivo**. *J Physiol* 1992, **447**:215-234.
10. Steriade M: **Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems**. *Neuroscience* 2006, **137**:1087-1106.
11. Timofeev I, Steriade M: **Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex and decorticated cats**. *J Neurophysiol* 1996, **76**:4152-4168.
12. Steriade M, Nunez A, Amzica F: **A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components**. *J Neurosci* 1993, **13**:3252-3265.
13. Steriade M, Nunez A, Amzica F: **Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram**. *J Neurosci* 1993, **13**:3266-3283.
14. Aserinsky E, Kleitman N: **Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep**. *Science* 1953, **118**:273-274.
15. Brooks PL, Peever JH: **Identification of the transmitter and receptor mechanisms responsible for REM sleep paralysis**. *J Neurosci* 2012, **32**:9785-9795.

16. Valencia Garcia S, Brischoux F, Clement O, Libourel PA, Arthaud S, Lazarus M, Luppi PH, Fort P: **Ventromedial medulla inhibitory neuron inactivation induces REM sleep without atonia and REM sleep behavior disorder.** *Nat Commun* 2018, **9**:504.
17. Franken P, Malafosse A, Tafti M: **Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998, **275**:R1127-R1137.
18. Vassalli A, Franken P: **Hypocretin (orexin) is critical in sustaining theta/gamma-rich waking behaviors that drive sleep need.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, **114**:E5464-e5473.
19. Simon AP, Poindessous-Jazat F, Dutar P, Epelbaum J, Bassant MH: **Firing properties of anatomically identified neurons in the medial septum of anesthetized and unanesthetized restrained rats.** *J Neurosci* 2006, **26**:9038-9046.
20. Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A: **Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation.** *Science* 2016, **352**:812-816.
21. Trachsel L, Tobler I, Achermann P, Borbely AA: **Sleep continuity and the REM-nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation.** *Physiol Behav* 1991, **49**:575-580.
22. Borbély AA, Achermann P: **Concepts and models of sleep regulation: an overview.** *J Sleep Res* 1992, **1**:63-79.
23. Mistlberger RE, Bergmann BM, Waldenar W, Rechtschaffen A: **Recovery sleep following sleep deprivation in intact and suprachiasmatic nuclei-lesioned rats.** *Sleep* 1983, **6**:217-233.
24. Borbely AA: **A two process model of sleep regulation.** *Hum Neurobiol* 1982, **1**:195-204.
25. Cirelli C, Huber R, Gopalakrishnan A, Southard TL, Tononi G: **Locus Ceruleus Control of Slow-Wave Homeostasis.** *J Neurosci* 2005, **25**:4503.
26. Franken P, Dijk DJ, Tobler I, Borbely AA: **Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature.** *Am J Physiol* 1991, **261**:R198-208.
27. Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG: **Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss.** *Neuron* 2009, **61**:213-219.
28. Borbely AA, Daan S, Wirz-Justice A, Deboer T: **The two-process model of sleep regulation: a reappraisal.** *J Sleep Res* 2016, **25**:131-143.
29. Vyazovskiy VV, Olcese U, Lazimy YM, Faraguna U, Esser SK, Williams JC, Cirelli C, Tononi G: **Cortical firing and sleep homeostasis.** *Neuron* 2009, **63**:865-878.
30. Riedner BA, Vyazovskiy VV, Huber R, Massimini M, Esser S, Murphy M, Tononi G: **Sleep homeostasis and cortical synchronization: III. A high-density EEG study of sleep slow waves in humans.** *Sleep* 2007, **30**:1643-1657.
31. Nir Y, Staba Richard J, Andrillon T, Vyazovskiy Vladyslav V, Cirelli C, Fried I, Tononi G: **Regional Slow Waves and Spindles in Human Sleep.** *Neuron* 2011, **70**:153-169.
32. Kattler H, Dijk DJ, Borbely AA: **Effect of unilateral somatosensory stimulation prior to sleep on the sleep EEG in humans.** *J Sleep Res* 1994, **3**:159-164.

33. Vyazovskiy V, Borbely AA, Tobler I: **Unilateral vibrissae stimulation during waking induces interhemispheric EEG asymmetry during subsequent sleep in the rat.** *J Sleep Res* 2000, **9**:367-371.
34. Finelli LA, Baumann H, Borbely AA, Achermann P: **Dual electroencephalogram markers of human sleep homeostasis: correlation between theta activity in waking and slow-wave activity in sleep.** *Neuroscience* 2000, **101**:523-529.
35. Vyazovskiy VV, Tobler I: **Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat.** *Brain Res* 2005, **1050**:64-71.
36. Grønli J, Rempe MJ, Clegern WC, Schmidt M, Wisor JP: **Beta EEG reflects sensory processing in active wakefulness and homeostatic sleep drive in quiet wakefulness.** *J Sleep Res* 2016, **25**:257-268.
37. Dijk DJ, Beersma DGM, van den Hoofdakker RH: **All night spectral analysis of EEG sleep in young adult and middle-aged male subjects.** *Neurobiol Aging* 1989, **10**:677-682.
38. Mander BA, Rao V, Lu B, Saletin JM, Lindquist JR, Ancoli-Israel S, Jagust W, Walker MP: **Prefrontal atrophy, disrupted NREM slow waves and impaired hippocampal-dependent memory in aging.** *Nat Neurosci* 2013, **16**:357-364.
39. Ringli M, Huber R: **Developmental aspects of sleep slow waves: Linking sleep, brain maturation and behavior.** In *Prog Brain Res*. Edited by Van Someren EJW, Van Der Werf YD, Roelfsema PR, Mansvelder HD, Lopes Da Silva FH: Elsevier; 2011:63-82. *Slow Brain Oscillations of Sleep, Resting State and Vigilance*, vol 193.
40. Plante DT, Goldstein MR, Cook JD, Smith R, Riedner BA, Rumble ME, Jelenchick L, Roth A, Tononi G, Benca RM, et al.: **Effects of oral temazepam on slow waves during non-rapid eye movement sleep in healthy young adults: A high-density EEG investigation.** *Int J Psychophysiol* 2016, **101**:25-32.
41. Wright NA, Belyavin A, Borland RG, Nicholson AN: **Modulation of delta activity by hypnotics in middle-aged subjects: studies with a benzodiazepine (flurazepam) and a cyclopyrrolone (zopiclone).** *Sleep* 1986, **9**:348-352.
42. Franken P, Chollet D, Tafti M: **The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control.** *J Neurosci* 2001, **21**:2610-2621.
43. Franken P, Malafosse A, Tafti M: **Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice.** *Sleep* 1999, **22**:155-169.
44. Mackiewicz M, Paigen B, Naidoo N, Pack AI: **Analysis of the QTL for sleep homeostasis in mice: Homer1a is a likely candidate.** *Physiol Genomics* 2008, **33**:91-99.
45. Curie T, Mongrain V, Dorsaz S, Mang GM, Emmenegger Y, Franken P: **Homeostatic and circadian contribution to EEG and molecular state variables of sleep regulation.** *Sleep* 2013, **36**:311-323.
46. Xiao B, Tu JC, Petralia RS, Yuan JP, Doan A, Breder CD, Ruggiero A, Lanahan AA, Wenthold RJ, Worley PF: **Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins.** *Neuron* 1998, **21**:707-716.

47. Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF: **Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors.** *Nature* 1997, **386**:284-288.
48. Sato M, Suzuki K, Nakanishi S: **NMDA Receptor Stimulation and Brain-Derived Neurotrophic Factor Upregulate Homer 1a mRNA via the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Cultured Cerebellar Granule Cells.** *J Neurosci* 2001, **21**:3797.
49. Huber R, Tononi G, Cirelli C: **Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis.** *Sleep* 2007, **30**:129-139.
50. Holst SC, Sousek A, Hefti K, Saberi-Moghadam S, Buck A, Ametamey SM, Scheidegger M, Franken P, Henning A, Seifritz E, et al.: **Cerebral mGluR5 availability contributes to elevated sleep need and behavioral adjustment after sleep deprivation.** *eLife* 2017, **6**.
51. Wang Z, Ma J, Miyoshi C, Li Y, Sato M, Ogawa Y, Lou T, Ma C, Gao X, Lee C, et al.: **Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need.** *Nature* 2018, **558**:435-439.
52. Chikahisa S, Fujiki N, Kitaoka K, Shimizu N, Sei H: **Central AMPK contributes to sleep homeostasis in mice.** *Neuropharmacology* 2009, **57**:369-374.
53. Halassa MM, Haydon PG: **Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior.** *Annu Rev Physiol* 2010, **72**:335-355.
54. Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW: **Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness.** *Science* 1997, **276**:1265-1268.
55. Van den Pol AN: **The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy.** *J Comp Neurol* 1980, **191**:661-702.
56. Edgar DM, Dement WC, Fuller CA: **Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep-wake regulation.** *J Neurosci* 1993, **13**:1065-1079.
57. Moore RY, Eichler VB: **Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.** *Brain Res* 1972, **42**:201-206.
58. Stephan FK, Zucker I: **Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972, **69**:1583-1586.
59. Schaap J, Albus H, vanderLeest HT, Eilers PHC, D  t  ri L, Meijer JH: **Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:15994.
60. Franken P, Dijk DJ: **Circadian clock genes and sleep homeostasis.** *Eur J Neurosci* 2009, **29**:1820-1829.
61. Lowrey PL, Takahashi JS: **Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms.** *Adv Genet* 2011, **74**:175-230.
62. Klerman EB, Gershengorn HB, Duffy JF, Kronauer RE: **Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker.** *J Biol Rhythms* 2002, **17**:181-193.

63. Knoblauch V, Martens W, Wirz-Justice A, Krauchi K, Cajochen C: **Regional differences in the circadian modulation of human sleep spindle characteristics.** *Eur J Neurosci* 2003, **18**:155-163.
64. Dijk DJ, Czeisler CA: **Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans.** *J Neurosci* 1995, **15**:3526-3538.
65. Dijk DJ, Shanahan TL, Duffy JF, Ronda JM, Czeisler CA: **Variation of electroencephalographic activity during non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep with phase of circadian melatonin rhythm in humans.** *J Physiol* 1997, **505 (Pt 3)**:851-858.
66. Yassenkov R, Deboer T: **Circadian regulation of sleep and the sleep EEG under constant sleep pressure in the rat.** *Sleep* 2010, **33**:631-641.
67. Dijk D-J, Cajochen C: **Melatonin and the Circadian Regulation of Sleep Initiation, Consolidation, Structure, and the Sleep EEG.** *J Biol Rhythms* 1997, **12**:627-635.
68. Deboer T: **Sleep homeostasis and the circadian clock: Do the circadian pacemaker and the sleep homeostat influence each other's functioning?** *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms* 2018, **5**:68-77.
69. Vyazovskiy VV, Achermann P, Tobler I: **Sleep homeostasis in the rat in the light and dark period.** *Brain Res Bull* 2007, **74**:37-44.
70. Deboer T: **Sleep and sleep homeostasis in constant darkness in the rat.** *J Sleep Res* 2009, **18**:357-364.
71. Dijk DJ, Archer SN: **PERIOD3, circadian phenotypes, and sleep homeostasis.** *Sleep Med Rev* 2010, **14**:151-160.
72. Franken P, Dudley CA, Estill SJ, Barakat M, Thomason R, O'Hara BF, McKnight SL: **NPAS2 as a transcriptional regulator of non-rapid eye movement sleep: genotype and sex interactions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:7118-7123.
73. Wisor JP, O'Hara BF, Terao A, Selby CP, Kilduff TS, Sancar A, Edgar DM, Franken P: **A role for cryptochromes in sleep regulation.** *BMC Neurosci* 2002, **3**:20.
74. Franken P, Thomason R, Heller HC, O'Hara BF: **A non-circadian role for clock-genes in sleep homeostasis: a strain comparison.** *BMC Neurosci* 2007, **8**:87.
75. Mongrain V, Hernandez SA, Pradervand S, Dorsaz S, Curie T, Hagiwara G, Gip P, Heller HC, Franken P: **Separating the contribution of glucocorticoids and wakefulness to the molecular and electrophysiological correlates of sleep homeostasis.** *Sleep* 2010, **33**:1147-1157.
76. Challet E, Turek FW, Laute M, Van Reeth O: **Sleep deprivation decreases phase-shift responses of circadian rhythms to light in the mouse: role of serotonergic and metabolic signals.** *Brain Res* 2001, **909**:81-91.
77. Mistlberger RE, Landry GJ, Marchant EG: **Sleep deprivation can attenuate light-induced phase shifts of circadian rhythms in hamsters.** *Neurosci Lett* 1997, **238**:5-8.



78. Wyatt JK, Ritz-De Cecco A, Czeisler CA, Dijk DJ: **Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans living on a 20-h day.** *Am J Physiol* 1999, **277**:R1152-1163.
79. Moruzzi G, Magoun HW: **Brain stem reticular formation and activation of the EEG. 1949.** *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1995, **7**:251-267.
80. Jones BE: **The organization of central cholinergic systems and their functional importance in sleep-waking states.** In *Cholinergic Function and Dysfunction*, 1st ed. Edited by: Elsevier Science; 1993:61-71. [Cuello AC (Series Editor): Progress in brain research, vol 98.]
81. Szymusiak R, Alam N, McGinty D: **Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep.** *Behav Brain Res* 2000, **115**:171-182.
82. Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW: **Control of Sleep and Wakefulness.** *Physiol Rev* 2012, **92**:1087-1187.
83. Aston-Jones G, Bloom FE: **Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle.** *J Neurosci* 1981, **1**:876-886.
84. McGinty DJ, Harper RM: **Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats.** *Brain Res* 1976, **101**:569-575.
85. Lin JS, Sakai K, Jouvet M: **Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat.** *Neuropharmacology* 1988, **27**:111-122.
86. Fuller P, Sherman D, Pedersen NP, Saper CB, Lu J: **Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system.** *J Comp Neurol* 2011, **519**:933-956.
87. Saper CB, Fuller PM: **Wake-sleep circuitry: an overview.** *Curr Opin Neurobiol* 2017, **44**:186-192.
88. Gompf HS, Mathai C, Fuller PM, Wood DA, Pedersen NP, Saper CB, Lu J: **Locus Ceruleus and Anterior Cingulate Cortex Sustain Wakefulness in a Novel Environment.** *J Neurosci* 2010, **30**:14543-14551.
89. Petrovic J, Ciric J, Lazic K, Kalauzi A, Saponjic J: **Lesion of the pedunculo pontine tegmental nucleus in rat augments cortical activation and disturbs sleep/wake state transitions structure.** *Exp Neurol* 2013, **247**:562-571.
90. Jones BE: **Arousal and sleep circuits.** *Neuropsychopharmacology* 2019.
91. Saper CB, Scammell TE, Lu J: **Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms.** *Nature* 2005, **437**:1257-1263.
92. Xu M, Chung S, Zhang S, Zhong P, Ma C, Chang WC, Weissbourd B, Sakai N, Luo L, Nishino S, et al.: **Basal forebrain circuit for sleep-wake control.** *Nat Neurosci* 2015, **18**:1641-1647.
93. Anaclet C, Pedersen NP, Ferrari LL, Venner A, Bass CE, Arrigoni E, Fuller PM: **Basal forebrain control of wakefulness and cortical rhythms.** *Nat Commun* 2015, **6**:8744.
94. Kim T, Thankachan S, McKenna JT, McNally JM, Yang C, Choi JH, Chen L, Kocsis B, Deisseroth K, Strecker RE, et al.: **Cortically projecting basal forebrain parvalbumin neurons regulate cortical gamma band oscillations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:3535.

95. Kaur S, Pedersen NP, Yokota S, Hur EE, Fuller PM, Lazarus M, Chamberlin NL, Saper CB: **Glutamatergic signaling from the parabrachial nucleus plays a critical role in hypercapnic arousal.** *J Neurosci* 2013, **33**:7627-7640.
96. Wang HL, Morales M: **Pedunculo pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat.** *Eur J Neurosci* 2009, **29**:340-358.
97. Kroeger D, Ferrari LL, Petit G, Mahoney CE, Fuller PM, Arrigoni E, Scammell TE: **Cholinergic, Glutamatergic, and GABAergic Neurons of the Pedunculo pontine Tegmental Nucleus Have Distinct Effects on Sleep/Wake Behavior in Mice.** *J Neurosci* 2017, **37**:1352-1366.
98. Eban-Rothschild A, Rothschild G, Giardino WJ, Jones JR, de Lecea L: **VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors.** *Nat Neurosci* 2016, **19**:1356-1366.
99. Vertes RP: **PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat.** *J Comp Neurol* 1992, **326**:595-622.
100. Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM: **Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus.** *Anat Embryol (Berl)* 1979, **156**:165-176.
101. Vertes RP, McKenna JT: **Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus.** *Synapse* 2000, **38**:281-293.
102. Pedersen NP, Ferrari L, Venner A, Wang JL, Abbott SBG, Vujovic N, Arrigoni E, Saper CB, Fuller PM: **Supramammillary glutamate neurons are a key node of the arousal system.** *Nat Commun* 2017, **8**:1405.
103. Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE: **Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state.** *J Neurosci* 2001, **21**:1656-1662.
104. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L: **Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons.** *Nature* 2007, **450**:420-424.
105. Venner A, Anaclet C, Broadhurst RY, Saper CB, Fuller PM: **A Novel Population of Wake-Promoting GABAergic Neurons in the Ventral Lateral Hypothalamus.** *Curr Biol* 2016, **26**:2137-2143.
106. Herrera CG, Cadavieco MC, Jego S, Ponomarenko A, Korotkova T, Adamantidis A: **Hypothalamic feedforward inhibition of thalamocortical network controls arousal and consciousness.** *Nat Neurosci* 2016, **19**:290-298.
107. Luppi P-H, Fort P: **Sleep–wake physiology.** In *Clinical Neurophysiology: Basis and Technical Aspects*. Edited by Levin KH, Chauvel P: Elsevier; 2019:359-370. Handbook of Clinical Neurology, vol 160.
108. Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB: **Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat.** *J Neurosci* 1998, **18**:4705-4721.

109. Jégo S, Glasgow SD, Herrera CG, Ekstrand M, Reed SJ, Boyce R, Friedman J, Burdakov D, Adamantidis AR: **Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus.** *Nat Neurosci* 2013, **16**:1637-1643.
110. Hassani OK, Lee MG, Henny P, Jones BE: **Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle.** *J Neurosci* 2009, **29**:11828-11840.
111. Anaclet C, Lin JS, Vetrivelan R, Krenzer M, Vong L, Fuller PM, Lu J: **Identification and characterization of a sleep-active cell group in the rostral medullary brainstem.** *J Neurosci* 2012, **32**:17970-17976.
112. Anaclet C, Ferrari L, Arrigoni E, Bass CE, Saper CB, Lu J, Fuller PM: **GABAergic parafacial zone is a medullary slow-wave-sleep promoting center.** *Nat Neurosci* 2014, **17**:1217-1224.
113. Sun X, Whitefield S, Rusak B, Semba K: **Electrophysiological analysis of suprachiasmatic nucleus projections to the ventrolateral preoptic area in the rat.** *Eur J Neurosci* 2001, **14**:1257-1274.
114. Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB: **Afferents to the Ventrolateral Preoptic Nucleus.** *J Neurosci* 2002, **22**:977.
115. Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A, Scammell TE: **Afferents to the orexin neurons of the rat brain.** *J Comp Neurol* 2006, **494**:845-861.
116. Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y, Oshinsky ML: **A neural circuit for circadian regulation of arousal.** *Nat Neurosci* 2001, **4**:732-738.
117. Lu J, Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani P, Saper CB: **Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation.** *J Neurosci* 2001, **21**:4864-4874.
118. Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J: **Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms.** *J Neurosci* 2003, **23**:10691-10702.
119. Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW: **Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat.** *J Comp Neurol* 1996, **376**:143-173.
120. Deboer T, Vansteensel MJ, Détári L, Meijer JH: **Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons.** *Nat Neurosci* 2003, **6**:1086-1090.
121. Mirmiran M, Maas YGH, Ariagno RL: **Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms.** *Sleep Med Rev* 2003, **7**:321-334.
122. Reid KJ, Martinovich Z, Finkel S, Statsinger J, Golden R, Harter K, Zee PC: **Sleep: A Marker of Physical and Mental Health in the Elderly.** *Am J Geriatr Psychiatry* 2006, **14**:860-866.
123. Diekelmann S, Born J: **The memory function of sleep.** *Nat Rev Neurosci* 2010, **11**:114.
124. Yang G, Lai CS, Cichon J, Ma L, Li W, Gan WB: **Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning.** *Science* 2014, **344**:1173-1178.

125. Mackiewicz M, Shockley KR, Romer MA, Galante RJ, Zimmerman JE, Naidoo N, Baldwin DA, Jensen ST, Churchill GA, Pack AI: **Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep.** *Physiol Genomics* 2007, **31**:441-457.
126. Dworak M, McCarley RW, Kim T, Kalinchuk AV, Basheer R: **Sleep and Brain Energy Levels: ATP Changes during Sleep.** *J Neurosci* 2010, **30**:9007.
127. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, et al.: **Sleep drives metabolite clearance from the adult brain.** *Science* 2013, **342**:373-377.
128. Hafner M, Stepanek M, Taylor J, Troxel WM, van Stolk C: **Why Sleep Matters-The Economic Costs of Insufficient Sleep: A Cross-Country Comparative Analysis.** *Rand Health Q* 2017, **6**:11.
129. Said EA, Al-Abri MA, Al-Saidi I, Al-Balushi MS, Al-Busaidi JZ, Al-Reesi I, Koh CY, Idris MA, Al-Jabri AA, Habbal O: **Sleep deprivation alters neutrophil functions and levels of Th1-related chemokines and CD4(+) T cells in the blood.** *Sleep Breath* 2019.
130. Irwin M: **Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines.** *Brain Behav Immun* 2002, **16**:503-512.
131. Prather AA, Hall M, Fury JM, Ross DC, Muldoon MF, Cohen S, Marsland AL: **Sleep and antibody response to hepatitis B vaccination.** *Sleep* 2012, **35**:1063-1069.
132. Dominguez F, Fuster V, Fernandez-Alvira JM, Fernandez-Friera L, Lopez-Melgar B, Blanco-Rojo R, Fernandez-Ortiz A, Garcia-Pavia P, Sanz J, Mendiguren JM, et al.: **Association of Sleep Duration and Quality With Subclinical Atherosclerosis.** *J Am Coll Cardiol* 2019, **73**:134-144.
133. Cappuccio FP, Stranges S, Kandala NB, Miller MA, Taggart FM, Kumari M, Ferrie JE, Shipley MJ, Brunner EJ, Marmot MG: **Gender-specific associations of short sleep duration with prevalent and incident hypertension: the Whitehall II Study.** *Hypertension* 2007, **50**:693-700.
134. Li M, Yan S, Jiang S, Ma X, Gao T, Li B: **Relationship between sleep duration and hypertension in northeast China: a cross-sectional study.** *BMJ Open* 2019, **9**:e023916.
135. Grandner M, Mullington JM, Hashmi SD, Redeker NS, Watson NF, Morgenthaler TI: **Sleep Duration and Hypertension: Analysis of > 700,000 Adults by Age and Sex.** *J Clin Sleep Med* 2018, **14**:1031-1039.
136. Léger D, Beck F, Richard J-B, Sauvet F, Faraut B: **The Risks of Sleeping “Too Much”. Survey of a National Representative Sample of 24671 Adults (INPES Health Barometer).** *PloS One* 2014, **9**:e106950.
137. Gallicchio L, Kalesan B: **Sleep duration and mortality: a systematic review and meta-analysis.** *J Sleep Res* 2009, **18**:148-158.
138. Gariepy G, Janssen I, Sentenac M, Elgar FJ: **School start time and sleep in Canadian adolescents.** *J Sleep Res* 2017, **26**:195-201.
139. Voelker R: **Stress, sleep loss, and substance abuse create potent recipe for college depression.** *Jama* 2004, **291**:2177-2179.

140. Meerlo P, Havekes R, Steiger A: **Chronically Restricted or Disrupted Sleep as a Causal Factor in the Development of Depression.** In *Sleep, Neuronal Plasticity and Brain Function*. Edited by Meerlo P, Benca R, Abel T. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015:459-481. [Geyer MA, Ellenbroek BA, Marsden CA, Barnes TRE (Series Editor): *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, vol 25.]
141. Dawson D, Reid K: **Fatigue, alcohol and performance impairment.** *Nature* 1997, **388**:235.
142. Maltese F, Adda M, Bablon A, Hraeich S, Guervilly C, Lehingue S, Wiramus S, Leone M, Martin C, Viallet R, et al.: **Night shift decreases cognitive performance of ICU physicians.** *Intensive Care Med* 2016, **42**:393-400.
143. Havekes R, Abel T: **The tired hippocampus: the molecular impact of sleep deprivation on hippocampal function.** *Curr Opin Neurobiol* 2017, **44**:13-19.
144. Yoo SS, Hu PT, Gujar N, Jolesz FA, Walker MP: **A deficit in the ability to form new human memories without sleep.** *Nat Neurosci* 2007, **10**:385-392.
145. Eichenbaum H: **Hippocampus: Cognitive Processes and Neural Representations that Underlie Declarative Memory.** *Neuron* 2004, **44**:109-120.
146. Raven F, Meerlo P, Van der Zee EA, Abel T, Havekes R: **A brief period of sleep deprivation causes spine loss in the dentate gyrus of mice.** *Neurobiol Learn Mem* 2019, **160**:83-90.
147. Havekes R, Park AJ, Tudor JC, Luczak VG, Hansen RT, Ferri SL, Bruinenberg VM, Poplawski SG, Day JP, Aton SJ, et al.: **Sleep deprivation causes memory deficits by negatively impacting neuronal connectivity in hippocampal area CA1.** *eLife* 2016, **5**.
148. Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N: **Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory.** *Neuron* 2009, **61**:10-26.
149. Areal CC, Warby SC, Mongrain V: **Sleep loss and structural plasticity.** *Curr Opin Neurobiol* 2017, **44**:1-7.
150. Sonenberg N, Hinnebusch AG: **Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets.** *Cell* 2009, **136**:731-745.
151. Buttgereit F, Brand MD: **A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells.** *Biochem J* 1995, **312 (Pt 1)**:163-167.
152. Shatkin AJ: **Capping of eucaryotic mRNAs.** *Cell* 1976, **9**:645-653.
153. Sheets MD, Wickens M: **Two phases in the addition of a poly(A) tail.** *Genes Dev* 1989, **3**:1401-1412.
154. Sonenberg N, Rupprecht KM, Hecht SM, Shatkin AJ: **Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**:4345-4349.
155. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N: **eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:913-963.
156. Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC, Jr.: **mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin.** *EMBO J* 2006, **25**:1659-1668.

157. Proud CG: **Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery.** *Biochem J* 2007, **403**:217-234.
158. Kozak M: **The scanning model for translation: an update.** *J Cell Biol* 1989, **108**:229-241.
159. Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick WC, Sonenberg N: **Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation.** *EMBO J* 1994, **13**:1205-1215.
160. Rogers GW, Jr., Richter NJ, Merrick WC: **Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A.** *J Biol Chem* 1999, **274**:12236-12244.
161. Hiremath LS, Webb NR, Rhoads RE: **Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein.** *J Biol Chem* 1985, **260**:7843-7849.
162. Raught B, Gingras A-C: **eIF4E activity is regulated at multiple levels.** *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**:43-57.
163. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA: **Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2.** *EMBO J* 1997, **16**:1909-1920.
164. Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA: **Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:1871-1880.
165. Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE: **Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:7668-7672.
166. Amorim IS, Kedia S, Kouloulia S, Simbriger K, Gantois I, Jafarnejad SM, Li Y, Kampaite A, Pooters T, Romano N, et al.: **Loss of eIF4E phosphorylation engenders depression-like behaviors via selective mRNA translation.** *J Neurosci* 2018, **38**:2118-2133.
167. Banko JL, Hou L, Klann E: **NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1.** *J Neurochem* 2004, **91**:462-470.
168. Kelleher III RJ, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S: **Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory.** *Cell* 2004, **116**:467-479.
169. Cao R, Gkogkas CG, de Zavalía N, Blum ID, Yanagiya A, Tsukumo Y, Xu H, Lee C, Storch KF, Liu AC, et al.: **Light-regulated translational control of circadian behavior by eIF4E phosphorylation.** *Nat Neurosci* 2015, **18**:855-862.
170. Grønli J, Dagestad G, Milde AM, Murison R, Bramham CR: **Post-transcriptional effects and interactions between chronic mild stress and acute sleep deprivation: regulation of translation factor and cytoplasmic polyadenylation element-binding protein phosphorylation.** *Behav Brain Res* 2012, **235**:251-262.
171. Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N: **Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E.** *EMBO J* 1995, **14**:5701-5709.

172. Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N: **The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:4990-4997.
173. Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N: **4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family.** *J Biol Chem* 1998, **273**:14002-14007.
174. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., Sonenberg N: **Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function.** *Nature* 1994, **371**:762-767.
175. Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK: **Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G.** *Mol Cell* 1999, **3**:707-716.
176. Raught B, Gingras AC: **Signaling to Translation Initiation.** In *Translational Control in Biology and Medicine*. Edited by Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB: CSHL Press; 2007:381-384. Cold Spring Harbor Monograph Series
177. Tsukiyama-Kohara K, Vidal SM, Gingras AC, Glover TW, Hanash SM, Heng H, Sonenberg N: **Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2.** *Genomics* 1996, **38**:353-363.
178. Cao R, Robinson B, Xu H, Gkogkas C, Khoutorsky A, Alain T, Yanagiya A, Nevarko T, Liu AC, Amir S, et al.: **Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling.** *Neuron* 2013, **79**:712-724.
179. Khoutorsky A, Bonin RP, Sorge RE, Gkogkas CG, Pawlowski SA, Jafarnejad SM, Pitcher MH, Alain T, Perez-Sanchez J, Salter EW, et al.: **Translational control of nociception via 4E-binding protein 1.** *eLife* 2015, **4**.
180. Xu J-T, Zhao X, Yaster M, Tao Y-X: **Expression and distribution of mTOR, p70S6K, 4E-BP1, and their phosphorylated counterparts in rat dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn.** *Brain Res* 2010, **1336**:46-57.
181. Hartman NW, Lin TV, Zhang L, Paquelet GE, Feliciano DM, Bordey A: **mTORC1 Targets the Translational Repressor 4E-BP2, but Not S6 Kinase 1/2, to Regulate Neural Stem Cell Self-Renewal In Vivo.** *Cell Reports* 2013, **5**:433-444.
182. Ran I, Laplante I, Bourgeois C, Pepin J, Lacaille P, Costa-Mattioli M, Pelletier J, Sonenberg N, Lacaille JC: **Persistent transcription- and translation-dependent long-term potentiation induced by mGluR1 in hippocampal interneurons.** *J Neurosci* 2009, **29**:5605-5615.
183. Moon IS, Lee HJ, Park IS: **Dendritic eIF4E-binding protein 1 (eIF4E-BP1) mRNA is upregulated by neuronal activation.** *J Korean Med Sci* 2012, **27**:1241-1247.
184. Banko JL, Poulin F, Hou L, DeMaria CT, Sonenberg N, Klann E: **The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus.** *J Neurosci* 2005, **25**:9581-9590.
185. So L, Lee J, Palafox M, Mallya S, Woxland CG, Arguello M, Truitt ML, Sonenberg N, Ruggero D, Fruman DA: **The 4E-BP-eIF4E axis promotes rapamycin-sensitive growth and proliferation in lymphocytes.** *Sci Signal* 2016, **9**:ra57.

186. Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM: **A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:467-472.
187. Tsukiyama-Kohara K, Poulin F, Kohara M, DeMaria CT, Cheng A, Wu Z, Gingras A-C, Katsume A, Elchebly M, Spiegelman BM, et al.: **Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1.** *Nat Med* 2001, **7**:1128-1132.
188. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszyńska A, Aebersold R, Sonenberg N: **Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1.** *Genes Dev* 2001, **15**:2852-2864.
189. Ayuso MI, Hernández-Jiménez M, Martín ME, Salinas M, Alcázar A: **New Hierarchical Phosphorylation Pathway of the Translational Repressor eIF4E-binding Protein 1 (4E-BP1) in Ischemia-Reperfusion Stress.** *J Biol Chem* 2010, **285**:34355-34363.
190. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM: **RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:1432-1437.
191. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N: **Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism.** *Genes Dev* 1999, **13**:1422-1437.
192. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K: **The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif.** *J Biol Chem* 2003, **278**:15461-15464.
193. Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J: **TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function.** *Curr Biol* 2003, **13**:797-806.
194. Beugnet A, Wang X, Proud CG: **Target of Rapamycin (TOR)-signaling and RAIP Motifs Play Distinct Roles in the Mammalian TOR-dependent Phosphorylation of Initiation Factor 4E-binding Protein 1.** *J Biol Chem* 2003, **278**:40717-40722.
195. Tee AR, Proud CG: **Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:1674-1683.
196. Mitchell DC, Menon A, Garner AL: **Chemoproteomic Profiling Uncovers CDK4-Mediated Phosphorylation of the Translational Suppressor 4E-BP1.** *Cell Chem Biol* 2019.
197. Shin S, Wolgamott L, Tcherkezian J, Vallabhapurapu S, Yu Y, Roux PP, Yoon SO: **Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1.** *Oncogene* 2014, **33**:1690-1699.
198. Ito H, Ichiyanagi O, Naito S, Bilim VN, Tomita Y, Kato T, Nagaoka A, Tsuchiya N: **GSK-3 directly regulates phospho-4EBP1 in renal cell carcinoma cell-line: an intrinsic subcellular mechanism for resistance to mTORC1 inhibition.** *BMC Cancer* 2016, **16**:393-393.
199. Bidinosti M, Ran I, Sanchez-Carbente MR, Martineau Y, Gingras AC, Gkogkas C, Raught B, Bramham CR, Sossin WS, Costa-Mattioli M, et al.: **Postnatal deamidation of 4E-BP2 in brain**



**enhances its association with raptor and alters kinetics of excitatory synaptic transmission.** *Mol Cell* 2010, **37**:797-808.

200. Tudor JC, Davis EJ, Peixoto L, Wimmer ME, van Tilborg E, Park AJ, Poplawski SG, Chung CW, Havekes R, Huang J, et al.: **Sleep deprivation impairs memory by attenuating mTORC1-dependent protein synthesis.** *Sci Signal* 2016, **9**:ra41.
201. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, et al.: **mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs.** *Science* 2010, **328**:1172-1176.
202. Ayuso MI, Martinez-Alonso E, Salvador N, Bonova P, Regidor I, Alcázar A: **Dissociation of eIF4E-binding protein 2 (4E-BP2) from eIF4E independent of Thr37/Thr46 phosphorylation in the ischemic stress response.** *PloS One* 2015, **10**:e0121958-e0121958.
203. Qin X, Jiang B, Zhang Y: **4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein.** *Cell Cycle* 2016, **15**:781-786.
204. Aton SJ, Herzog ED: **Come Together, Right...Now: Synchronization of Rhythms in a Mammalian Circadian Clock.** *Neuron* 2005, **48**:531-534.
205. Ran I, Gkogkas CG, Vasuta C, Tartas M, Khoutorsky A, Laplante I, Parsyan A, Nevarko T, Sonenberg N, Lacaille JC: **Selective regulation of GluA subunit synthesis and AMPA receptor-mediated synaptic function and plasticity by the translation repressor 4E-BP2 in hippocampal pyramidal cells.** *J Neurosci* 2013, **33**:1872-1886.
206. Workman ER, Niere F, Raab-Graham KF: **mTORC1-dependent protein synthesis underlying rapid antidepressant effect requires GABABR signaling.** *Neuropharmacology* 2013, **73**:192-203.
207. Banko JL, Merhav M, Stern E, Sonenberg N, Rosenblum K, Klann E: **Behavioral alterations in mice lacking the translation repressor 4E-BP2.** *Neurobiol Learn Mem* 2007, **87**:248-256.
208. Gkogkas CG, Khoutorsky A, Ran I, Rampakakis E, Nevarko T, Weatherill DB, Vasuta C, Yee S, Truitt M, Dallaire P, et al.: **Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control.** *Nature* 2013, **493**:371-377.
209. Aguilar-Valles A, Matta-Camacho E, Khoutorsky A, Gkogkas C, Nader K, Lacaille JC, Sonenberg N: **Inhibition of Group I Metabotropic Glutamate Receptors Reverses Autistic-Like Phenotypes Caused by Deficiency of the Translation Repressor eIF4E Binding Protein 2.** *J Neurosci* 2015, **35**:11125-11132.
210. Wiebe S, Nagpal A, Truong VT, Park J, Skalecka A, He AJ, Gamache K, Khoutorsky A, Gantois I, Sonenberg N: **Inhibitory interneurons mediate autism-associated behaviors via 4E-BP2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019:201908126.
211. Banko JL, Hou L, Poulin F, Sonenberg N, Klann E: **Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression.** *J Neurosci* 2006, **26**:2167-2173.
212. Saxton RA, Sabatini DM: **mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.** *Cell* 2017, **169**:361-371.
213. Lipton JO, Sahin M: **The neurology of mTOR.** *Neuron* 2014, **84**:275-291.

214. Gangloff Y-G, Mueller M, Dann SG, Svoboda P, Sticker M, Spetz J-F, Um SH, Brown EJ, Cereghini S, Thomas G, et al.: **Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic Stem Cell development.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:9508.
215. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM: **mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery.** *Cell* 2002, **110**:163-175.
216. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM: **GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR.** *Mol Cell* 2003, **11**:895-904.
217. Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC, Jr.: **PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding.** *J Biol Chem* 2007, **282**:20036-20044.
218. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM: **DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival.** *Cell* 2009, **137**:873-886.
219. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN: **Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.** *J Antibiot* 1975, **28**:721-726.
220. Eng CP, Sehgal SN, Vezina C: **Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors.** *J Antibiot* 1984, **37**:1231-1237.
221. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH: **RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs.** *Cell* 1994, **78**:35-43.
222. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM: **Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton.** *Curr Biol* 2004, **14**:1296-1302.
223. Laplante M, Sabatini DM: **mTOR signaling at a glance.** *J Cell Sci* 2009, **122**:3589-3594.
224. Oh WJ, Jacinto E: **mTOR complex 2 signaling and functions.** *Cell Cycle* 2011, **10**:2305-2316.
225. Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J: **Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:13571.
226. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD: **The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:4104-4115.
227. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L: **Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling.** *Genes Dev* 2003, **17**:1829-1834.
228. Yadav RB, Burgos P, Parker AW, Iadevaia V, Proud CG, Allen RA, O'Connell JP, Jeshtadi A, Stubbs CD, Botchway SW: **mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging.** *BMC Cell Biol* 2013, **14**:3.

229. Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H: **Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites.** *J Neurosci* 2004, **24**:9760-9769.
230. Gangarossa G, Ceolin L, Paucard A, Lerner-Natoli M, Perroy J, Fagni L, Valjent E: **Repeated stimulation of dopamine D1-like receptor and hyperactivation of mTOR signaling lead to generalized seizures, altered dentate gyrus plasticity, and memory deficits.** *Hippocampus* 2014, **24**:1466-1481.
231. Sutton LP, Caron MG: **Essential role of D1R in the regulation of mTOR complex1 signaling induced by cocaine.** *Neuropharmacology* 2015, **99**:610-619.
232. Chiamulera C, di Chio M, Cavalleri L, Venniro M, Padovani L, Collo G: **Ketamine effects on mammalian target of rapamycin signaling in the mouse limbic system depend on functional dopamine D3 receptors.** *Neuroreport* 2018, **29**:615-620.
233. Meffre J, Chaumont-Dubel S, Mannoury la Cour C, Loiseau F, Watson DJ, Dekeyne A, Seveno M, Rivet JM, Gaven F, Deleris P, et al.: **5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia.** *EMBO Mol Med* 2012, **4**:1043-1056.
234. Wang Z, Liu S, Kakizaki M, Hirose Y, Ishikawa Y, Funato H, Yanagisawa M, Yu Y, Liu Q: **Orexin/hypocretin activates mTOR complex 1 (mTORC1) via an Erk/Akt-independent and calcium-stimulated lysosome v-ATPase pathway.** *J Biol Chem* 2014, **289**:31950-31959.
235. Chang X, Suo L, Xu N, Zhao Y: **Orexin-A Stimulates Insulin Secretion Through the Activation of the OX1 Receptor and Mammalian Target of Rapamycin in Rat Insulinoma Cells.** *Pancreas* 2019, **48**:568-573.
236. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ: **Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake.** *Science* 2006, **312**:927-930.
237. Gonzalez-Garcia I, Martinez de Morentin PB, Estevez-Salguero A, Contreras C, Romero-Pico A, Ferno J, Nogueiras R, Dieguez C, Tena-Sempere M, Tovar S, et al.: **mTOR signaling in the arcuate nucleus of the hypothalamus mediates the anorectic action of estradiol.** *J Endocrinol* 2018, **238**:177-186.
238. Martins L, Fernández-Mallo D, Novelle MG, Vázquez MJ, Tena-Sempere M, Nogueiras R, López M, Diéguez C: **Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin.** *PLoS One* 2012, **7**:e46923.
239. Inoki K, Zhu T, Guan KL: **TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.** *Cell* 2003, **115**:577-590.
240. Ishizuka Y, Kakiya N, Witters LA, Oshiro N, Shirao T, Nawa H, Takei N: **AMP-activated protein kinase counteracts brain-derived neurotrophic factor-induced mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in neurons.** *J Neurochem* 2013:n/a-n/a.
241. Seibt J, Dumoulin MC, Aton SJ, Coleman T, Watson A, Naidoo N, Frank MG: **Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo.** *Curr Biol* 2012, **22**:676-682.
242. Nakanishi H, Sun Y, Nakamura RK, Mori K, Ito M, Suda S, Namba H, Storch FI, Dang TP, Mendelson W, et al.: **Positive correlations between cerebral protein synthesis rates and deep sleep in Macaca mulatta.** *Eur J Neurosci* 1997, **9**:271-279.

243. Ramm P, Smith CT: **Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat.** *Physiol Behav* 1990, **48**:749-753.
244. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J: **mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events.** *Cell* 2005, **123**:569-580.
245. Lipton Jonathan O, Yuan Elizabeth D, Boyle Lara M, Ebrahimi-Fakhari D, Kwiatkowski E, Nathan A, Güttler T, Davis F, Asara John M, Sahin M: **The circadian protein BMAL1 regulates translation in response to S6K1-mediated phosphorylation.** *Cell* 2015, **161**:1138-1151.
246. Meyuhas O, Hornstein E: **Translational Control of TOP mRNAs.** In *Translational control of gene expression*. Edited by Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000:671-694.
247. Huang W, Zhu PJ, Zhang S, Zhou H, Stoica L, Galiano M, Krnjevic K, Roman G, Costa-Mattioli M: **mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory.** *Nat Neurosci* 2013, **16**:441-448.
248. Cao R, Lee B, Cho HY, Saklayen S, Obrietan K: **Photic regulation of the mTOR signaling pathway in the suprachiasmatic circadian clock.** *Mol Cell Neurosci* 2008, **38**:312-324.
249. Cao R, Li A, Cho HY, Lee B, Obrietan K: **Mammalian target of rapamycin signaling modulates photic entrainment of the suprachiasmatic circadian clock.** *J Neurosci* 2010, **30**:6302-6314.
250. Liu D, Stowie A, de Zavalia N, Leise T, Pathak SS, Drewes LR, Davidson AJ, Amir S, Sonenberg N, Cao R: **mTOR signaling in VIP neurons regulates circadian clock synchrony and olfaction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, **115**:E3296-e3304.
251. Lin TV, Hsieh L, Kimura T, Malone TJ, Bordey A: **Normalizing translation through 4E-BP prevents mTOR-driven cortical mislamination and ameliorates aberrant neuron integration.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, **113**:11330-11335.
252. Lipton JO, Boyle LM, Yuan ED, Hochstrasser KJ, Chifamba FF, Nathan A, Tsai PT, Davis F, Sahin M: **Aberrant proteostasis of BMAL1 underlies circadian abnormalities in a paradigmatic mTOR-opathy.** *Cell Reports* 2017, **20**:868-880.
253. Limoges E, Mottron L, Bolduc C, Berthiaume C, Godbout R: **Atypical sleep architecture and the autism phenotype.** *Brain* 2005, **128**:1049-1061.
254. Ballester P, Martinez MJ, Javaloyes A, Inda MM, Fernandez N, Gazquez P, Aguilar V, Perez A, Hernandez L, Richdale AL, et al.: **Sleep Problems in Adults With Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability.** *Autism Res* 2018.
255. Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M: **Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex.** *Nat Commun* 2012, **3**:1292.
256. Parente DJ, Garriga C, Baskin B, Douglas G, Cho MT, Araujo GC, Shinawi M: **Neurologin 2 nonsense variant associated with anxiety, autism, intellectual disability, hyperphagia, and obesity.** *Am J Med Genet A* 2017, **173**:213-216.

257. Ylisaukko-oja T, Rehnstrom K, Auranen M, Vanhala R, Alen R, Kempas E, Ellonen P, Turunen JA, Makkonen I, Riikonen R, et al.: **Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism.** *Eur J Hum Genet* 2005, **13**:1285-1292.
258. Bradshaw KD, Emptage NJ, Bliss TV: **A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP.** *Eur J Neurosci* 2003, **18**:3150-3152.
259. Hou L, Klann E: **Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression.** *J Neurosci* 2004, **24**:6352-6361.
260. Gallagher SM, Daly CA, Bear MF, Huber KM: **Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1.** *J Neurosci* 2004, **24**:4859-4864.
261. Bateup HS, Takasaki KT, Saulnier JL, Deneffrio CL, Sabatini BL: **Loss of Tsc1 in vivo impairs hippocampal mGluR-LTD and increases excitatory synaptic function.** *J Neurosci* 2011, **31**:8862-8869.
262. Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R: **Engineering a memory with LTD and LTP.** *Nature* 2014, **511**:348-352.
263. Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ: **Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons.** *J Neurosci* 2006, **26**:12977-12983.
264. Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M: **Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:3791.
265. Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G: **Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression.** *Neuron* 2004, **41**:35-43.
266. Vecsey CG, Peixoto L, Choi JH, Wimmer M, Jaganath D, Hernandez PJ, Blackwell J, Meda K, Park AJ, Hannenhalli S, et al.: **Genomic analysis of sleep deprivation reveals translational regulation in the hippocampus.** *Physiol Genomics* 2012, **44**:981-991.
267. Seibt J, Frank MG: **Translation regulation in sleep: Making experience last.** *Commun Integr Biol* 2012, **5**:491-495.
268. Jimenez-Anguiano A, Garcia-Garcia F, Mendoza-Ramirez JL, Duran- Vazquez A, Drucker-Colin R: **Brain distribution of vasoactive intestinal peptide receptors following REM sleep deprivation.** *Brain Res* 1996, **728**:37-46.
269. Bedont JL, LeGates TA, Buhr E, Bathini A, Ling JP, Bell B, Wu MN, Wong PC, Van Gelder RN, Mongrain V, et al.: **An LHX1-regulated transcriptional network controls sleep/wake coupling and thermal resistance of the central circadian clockworks.** *Curr Biol* 2017, **27**:128-136.
270. Hu WP, Li JD, Colwell CS, Zhou QY: **Decreased REM sleep and altered circadian sleep regulation in mice lacking vasoactive intestinal polypeptide.** *Sleep* 2011, **34**:49-56.
271. Lee SH, Cox CL: **Vasoactive intestinal peptide selectively depolarizes thalamic relay neurons and attenuates intrathalamic rhythmic activity.** *J Neurophysiol* 2003, **90**:1224-1234.

272. Sun QQ, Prince DA, Huguenard JR: **Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activate hyperpolarization-activated cationic current and depolarize thalamocortical neurons in vitro.** *J Neurosci* 2003, **23**:2751-2758.
273. El Helou J, Belanger-Nelson E, Freyburger M, Dorsaz S, Curie T, La Spada F, Gaudreault PO, Beaumont E, Pouliot P, Lesage F, et al.: **Neurologin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:9974-9979.
274. Easton A, Meerlo P, Bergmann B, Turek FW: **The suprachiasmatic nucleus regulates sleep timing and amount in mice.** *Sleep* 2004, **27**:1307-1318.
275. Marston OJ, Williams RH, Canal MM, Samuels RE, Upton N, Piggins HD: **Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons.** *Molecular Brain* 2008, **1**:19.
276. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, et al.: **Narcolepsy in orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation.** *Cell* 1999, **98**:437-451.
277. Aldrich MS: **Diagnostic aspects of narcolepsy.** *Neurology* 1998, **50**:S2.
278. Sudhof TC: **Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease.** *Nature* 2008, **455**:903-911.
279. Jedlicka P, Vnencak M, Krueger DD, Jungenitz T, Brose N, Schwarzacher SW: **Neuroligin-1 regulates excitatory synaptic transmission, LTP and EPSP-spike coupling in the dentate gyrus in vivo.** *Brain Struct Funct* 2015, **220**:47-58.
280. Deco G, Ponce-Alvarez A, Hagmann P, Romani GL, Mantini D, Corbetta M: **How local excitation-inhibition ratio impacts the whole brain dynamics.** *J Neurosci* 2014, **34**:7886-7898.
281. Chellappa SL, Gaggioni G, Ly JQM, Papachilleos S, Borsu C, Brzozowski A, Rosanova M, Sarasso S, Luxen A, Middleton B, et al.: **Circadian dynamics in measures of cortical excitation and inhibition balance.** *Sci Rep* 2016, **6**:33661.
282. Huerta PT, Lisman JE: **Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state.** *Nature* 1993, **364**:723-725.
283. Wespataat V, Tennigkeit F, Singer W: **Phase sensitivity of synaptic modifications in oscillating cells of rat visual cortex.** *J Neurosci* 2004, **24**:9067-9075.
284. Uhlhaas PJ, Roux F, Rodriguez E, Rotarska-Jagiela A, Singer W: **Neural synchrony and the development of cortical networks.** *Trends Cogn Sci* 2010, **14**:72-80.
285. Gonzalez-Burgos G, Lewis DA: **GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia.** *Schizophr Bull* 2008, **34**:944-961.
286. Ye AX, Leung RC, Schäfer CB, Taylor MJ, Doesburg SM: **Atypical resting synchrony in autism spectrum disorder.** *Hum Brain Mapp* 2014, **35**:6049-6066.
287. Buzsaki G, Chrobak JJ: **Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks.** *Curr Opin Neurobiol* 1995, **5**:504-510.

288. Chen JY, Chauvette S, Skorheim S, Timofeev I, Bazhenov M: **Interneuron-mediated inhibition synchronizes neuronal activity during slow oscillation.** *J Physiol* 2012, **590**:3987-4010.
289. Fukunaga I, Herb JT, Kollo M, Boyden ES, Schaefer AT: **Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb.** *Nat Neurosci* 2014, **17**:1208-1216.
290. Buzsáki G: **Theta Oscillations in the Hippocampus.** *Neuron* 2002, **33**:325-340.
291. Robinson J, Manseau F, Ducharme G, Amilhon B, Vigneault E, El Mestikawy S, Williams S: **Optogenetic Activation of Septal Glutamatergic Neurons Drive Hippocampal Theta Rhythms.** *J Neurosci* 2016, **36**:3016-3023.
292. Vandecasteele M, Varga V, Berenyi A, Papp E, Bartho P, Venance L, Freund TF, Buzsaki G: **Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:13535-13540.
293. Lehmann M, Schreiner T, Seifritz E, Rasch B: **Emotional arousal modulates oscillatory correlates of targeted memory reactivation during NREM, but not REM sleep.** *Sci Rep* 2016, **6**:39229.
294. Schreiner T, Doeller CF, Jensen O, Rasch B, Staudigl T: **Theta Phase-Coordinated Memory Reactivation Reoccurs in a Slow-Oscillatory Rhythm during NREM Sleep.** *Cell reports* 2018, **25**:296-301.
295. Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, Ramesh V, Silva AJ: **Reversal of learning deficits in a Tsc2+/- mouse model of tuberous sclerosis.** *Nat Med* 2008, **14**:843-848.
296. Funk Chadd M, Honjoh S, Rodriguez Alexander V, Cirelli C, Tononi G: **Local slow waves in superficial layers of primary cortical areas during REM sleep.** *Curr Biol* 2016, **26**:396-403.
297. Steriade M, Iosif G, Apostol V: **Responsiveness of thalamic and cortical motor relays during arousal and various stages of sleep.** *J Neurophysiol* 1969, **32**:251-265.
298. Chang X, Zhao Y, Guo L: **Effect of Orexin-A on Cortisol Secretion in H295R Cells via p70S6K/4EBP1 Signaling Pathway.** *Int J Endocrinol* 2015, **2015**:6.
299. Dijk D-J, Hayes B, Czeisler CA: **Dynamics of electroencephalographic sleep spindles and slow wave activity in men: effect of sleep deprivation.** *Brain Res* 1993, **626**:190-199.
300. De Gennaro L, Ferrara M: **Sleep spindles: an overview.** *Sleep Med Rev* 2003, **7**:423-440.
301. Guazzelli M, Feinberg I, Aminoff M, Fein G, Floyd TC, Maggini C: **Sleep spindles in normal elderly: comparison with young adult patterns and relation to nocturnal awakening, cognitive function and brain atrophy.** *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1986, **63**:526-539.
302. Laventure S, Pinsard B, Lungu O, Carrier J, Fogel S, Benali H, Lina J-M, Boutin A, Doyon J: **Beyond spindles: interactions between sleep spindles and boundary frequencies during cued reactivation of motor memory representations.** *Sleep* 2018, **41**.
303. Lindemann C, Ahlbeck J, Bitzenhofer SH, Hanganu-Opatz IL: **Spindle Activity Orchestrates Plasticity during Development and Sleep.** *Neural Plast* 2016, **2016**:5787423.

304. Ulrich D: **Sleep Spindles as Facilitators of Memory Formation and Learning.** *Neural Plast* 2016, **2016**:1796715.
305. McCormick DA, Bal T: **Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms.** *Annu Rev Neurosci* 1997, **20**:185-215.
306. Aeschbach D, Borbely AA: **All-night dynamics of the human sleep EEG.** *J Sleep Res* 1993, **2**:70-81.
307. Uchida S, Maloney T, March JD, Azari R, Feinberg I: **Sigma (12-15 Hz) and delta (0.3-3 Hz) EEG oscillate reciprocally within NREM sleep.** *Brain Res Bull* 1991, **27**:93-96.
308. Shor B, Wu J, Shakey Q, Toral-Barza L, Shi C, Follettie M, Yu K: **Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells.** *J Biol Chem* 2010, **285**:15380-15392.
309. Baj G, Pinheiro V, Vaghi V, Tongiorgi E: **Signaling pathways controlling activity-dependent local translation of BDNF and their localization in dendritic arbors.** *J Cell Sci* 2016, **129**:2852-2864.
310. Schrott GM, Nigh EA, Chen WG, Hu L, Greenberg ME: **BDNF Regulates the Translation of a Select Group of mRNAs by a Mammalian Target of Rapamycin-Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathway during Neuronal Development.** *J Neurosci* 2004, **24**:7366.
311. Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E: **Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:16813-16818.
312. Holt CE, Martin KC, Schuman EM: **Local translation in neurons: visualization and function.** *Nat Struct Mol Biol* 2019, **26**:557-566.
313. Hafner AS, Donlin-Asp PG, Leitch B, Herzog E, Schuman EM: **Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments.** *Science* 2019, **364**.
314. Vaghi V, Polacchini A, Baj G, Pinheiro VL, Vicario A, Tongiorgi E: **Pharmacological profile of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) splice variant translation using a novel drug screening assay: a "quantitative code".** *J Biol Chem* 2014, **289**:27702-27713.
315. Liu Q-R, Lu L, Zhu X-G, Gong J-P, Shaham Y, Uhl GR: **Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine.** *Brain Res* 2006, **1067**:1-12.
316. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T: **Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited.** *J Neurosci Res* 2007, **85**:525-535.
317. Maynard KR, Hobbs JW, Sukumar M, Kardian AS, Jimenez DV, Schloesser RJ, Martinowich K: **Bdnf mRNA splice variants differentially impact CA1 and CA3 dendrite complexity and spine morphology in the hippocampus.** *Brain Struct Funct* 2017, **222**:3295-3307.
318. Mamantopoulos M, Ronchi F, McCoy KD, Wullaert A: **Inflammasomes make the case for littermate-controlled experimental design in studying host-microbiota interactions.** *Gut Microbes* 2018, **9**:374-381.
319. Fairless AH, Dow HC, Kriebich AS, Torre M, Kuruvilla M, Gordon E, Morton EA, Tan J, Berrettini WH, Li H, et al.: **Sociability and brain development in BALB/cJ and C57BL/6J mice.** *Behav Brain Res* 2012, **228**:299-310.



320. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, et al.: **Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:10604-10609.
321. Le Bacquer O, Combe K, Patrac V, Ingram B, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C, Salles J, Giraudet C, Guillet C, et al.: **4E-BP1 and 4E-BP2 double knockout mice are protected from aging-associated sarcopenia**. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2019, **10**:696-709.
322. Pearl D: **Role of 4E-BP-dependent Translational Control in Metabolic Disorders and Macrophage Polarization**. Masters of Science thesis. McGill University. 2017. McGill Library and Collections (160791)
323. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H: **Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells**. *Science* 1995, **268**:1766-1769.
324. van Eghen AM, Numis AI, Staley BA, Therrien SE, Thibert RL, Thiele EA: **Characterizing sleep disorders of adults with tuberous sclerosis complex: a questionnaire-based study and review**. *E&B* 2011, **20**:68-74.

## Matériel et méthodes supplémentaires : souris mTOR

Animaux.

Les souris mTOR<sup>flx/flx</sup> ont été générées en insérant des sites loxP en amont du promoteur et après l'exon5 [214], puis croisées avec des souris qui expriment la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV), un promoteur exprimé de façon ubiquitaire [178] afin d'obtenir les souris mTOR<sup>flx/-</sup>. Les souris sont de la souche C57BL/6. Neuf souris par groupe ont été utilisées.

